



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, A61K 39/21, 39/385, 39/395, C07K 16/28, G01N 33/577		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/02344 (43) Date de publication internationale: 23 janvier 1997 (23.01.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01006</p> <p>(22) Date de dépôt international: 28 juin 1996 (28.06.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/07914 30 juin 1995 (30.06.95) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CHERMANN, Jean-Claude [FR/FR]; 8 Les Ombrées, 1, route de la Treille, F-13011 Marseille (FR). LE CONTEL, Carole [FR/FR]; 172, La Canebière, F-13001 Marseille (FR). GALEA, Pascale [FR/FR]; La Rouvière, Bâtiment D1, 83, boulevard du Redon, F-13009 Marseille (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: VACCINE FOR INFECTIOUS AGENTS, COMPOSITION FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTIONS</p> <p>(54) Titre: VACCIN CONTRE DES AGENTS INFECTIEUX, COMPOSITION POUR LE TRAITEMENT ET LA PREVENTION DES INFECTIONS A HIV</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A vaccine for treating and/or preventing infectious diseases where the infectious agent has at least one intracellular phase in the host during its multiplication cycle, is disclosed. The vaccine comprises at least one cryptic epitope of a cellular element that is carried along by an intracellular infectious agent as it leaves the cell, and revealed by said infectious agent. A composition for treating and/or preventing HIV infections, antibodies to a peptide of interest, and a diagnostic method, are also disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un vaccin destiné au traitement et/ou à la prévention de maladies d'origine infectieuse, l'agent infectieux ayant au moins une phase intracellulaire chez l'hôte lors de son cycle de multiplication, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un épitope cryptique d'un élément cellulaire emporté par un agent infectieux intracellulaire lors de son passage à l'extérieur de la cellule et qui est dévoilé par l'agent infectieux. Elle concerne également une composition destinée au traitement ou à la prévention des infections à HIV, des anticorps dirigés contre un peptide d'intérêt et un procédé de diagnostic.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

VACCIN CONTRE DES AGENTS INFECTIEUX AYANT UNE PHASE INTRACELLULAIRE, COMPOSITION POUR LE TRAITEMENT ET LA PRÉVENTION DES INFECTIONS À HIV, ANTICORPS ET PROCÉDÉ DE DIAGNOSTIC.

La présente invention concerne de nouveaux types de vaccins et notamment des compositions destinées au traitement, à la prévention et au diagnostic des affections à HIV.

Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides capables de produire une réponse immunitaire susceptible de directement ou indirectement neutraliser les virus HIV chez les mammifères et notamment chez l'homme.

On a déjà décrit, notamment dans le brevet EP-B- 0470989 ainsi que dans différentes publications, l'importance des anticorps monoclonaux dirigés contre la β 2 microglobuline (β 2m) dans l'inhibition de la réplication de HIV-1.

En particulier, il a pu être mis en évidence que ces anticorps agissaient sur deux mécanismes, à savoir, directement sur le virus et sur les cellules associées à la β 2m.

La présente invention constitue des développements de ces éléments préliminaires et repose sur la mise en évidence de séquences peptidiques provenant de β 2m ou ayant une structure équivalente susceptibles de générer des anticorps neutralisant totalement ou partiellement les virus HIV.

Compte tenu de la complexité des mécanismes mis en oeuvre on entendra par "neutralisation du virus HIV" tout mécanisme ayant pour effet *in vivo* de détruire et/ou d'empêcher la propagation des virus.

In vitro, ces anticorps neutralisants peuvent être utilisés pour neutraliser tout fluide corporel destiné à être réinoculé ou réintroduit chez l'homme, comme le sperme d'un homme HIV séropositif pour l'insémination d'une femme séronégative.

Mais, plus généralement, la présente invention repose sur une nouvelle approche vaccinale utilisable, en particulier, pour les agents infectieux type parasite ou virus à fort pouvoir de mutation. En effet, dans le cadre de la vaccination traditionnelle on cherche à générer des anticorps neutralisants dirigés contre des éléments de l'agent infectieux, mais lorsque celui-ci présente un fort pouvoir de mutation, tel que le HIV par exemple, cette stratégie ne donne, au mieux, que des résultats limités

pour un isolat particulier qui sera remplacé très vite par un isolat mutant et résistant.

La nouvelle approche vaccinante repose sur un concept différent et est applicable à un certain nombre d'agents infectieux qui 5 présentent une phase intracellulaire lors de leur cycle.

En effet, on sait pour certains agents, ou on peut mettre en évidence, notamment dans le cas de HIV, ce qui constitue une partie de la présente invention, que, lors de la multiplication des agents infectieux à partir des cellules infectées de l'hôte, les agents infectieux extracellulaires 10 emportent des éléments de déterminants de la cellule hôte.

L'un des objets de la présente invention consiste à prendre comme cible, non pas l'agent infectieux lui-même, mais les éléments du déterminant qu'il emporte avec lui et de prévoir une vaccination dirigée contre ces déterminants cellulaires qui resteront constants, même si 15 l'agent lui-même a muté.

Ce type d'approche présente bien entendu une limite immédiate, l'antigène étant lié aux cellules hôtes, il n'est possible de réaliser une telle vaccination qu'avec un épitope cryptique du déterminant cellulaire qui ne sera dévoilé que lorsqu'il sera emporté par 20 l'agent infectieux extracellulaire, ou un épitope non-immunogène dans sa présentation naturelle par la cellule et modifié lorsqu'il est présenté à la surface du virion.

Dans le cas de HIV par exemple, on a pu mettre en évidence que la β 2 microglobuline présentait plusieurs épitopes cryptiques, lesquels 25 étaient dévoilés lors de la multiplication du virus HIV et son passage à l'extérieur de la cellule. Il n'y a donc pas, en cas de vaccination, d'une part de réaction auto-immune, et, d'autre part, l'épitope étant lié aux différents isolats de HIV qui ont été testés, la vaccination est efficace, et ceci indépendamment des mutations du virus lui-même.

30 Ce type de vaccination peut être retenu, notamment, pour les parasites intracellulaires et les virus enveloppés tels que CMV, HPV, HSV et HIV par exemple.

Il faut bien comprendre que si ce type de vaccination n'est pas utilisable dans tous les cas, il peut constituer une alternative très 35 intéressante pour les agents infectieux résistant aux approches plus traditionnelles.

C'est pourquoi la présente invention concerne un vaccin contre un agent infectieux, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un épitope cryptique d'un élément cellulaire emporté par un agent infectieux intracellulaire lors de son passage à l'extérieur de la cellule et qui est dévoilé par l'agent infectieux.

De préférence, cet agent infectieux est un parasite ou un virus à enveloppe et l'épitope cryptique est situé au voisinage de la surface de la cellule.

Par "épitope cryptique", on entend désigner un épitope d'un déterminant cellulaire de l'hôte qui est caché ou modifié et est donc reconnu comme étranger par le système immunitaire et ne produit donc pas de réaction auto-immune avec destruction du déterminant correspondant et peut être utilisé pour la vaccination.

L'épitope cryptique doit évidemment être dévoilé, c'est-à-dire être accessible et reconnu par le système immunitaire lorsqu'il est emporté par l'agent infectieux (dans le cas où il resterait cryptique, la vaccination ne serait pas possible).

Dans le cas de la $\beta 2$ microglobuline, on a pu mettre en évidence l'existence de ce type d'épitope qui d'ailleurs se découvre également sous forme naturelle lors de l'élimination de la $\beta 2$ microglobuline par voie urinaire.

La présente invention concerne donc des compositions destinées au traitement ou à la prévention des infections à HIV, caractérisées en ce qu'elles comportent à titre de principe actif au moins un peptide correspondant aux séquences 1 à 22 ou une séquence équivalente. Par "séquence équivalente", on entend désigner une séquence qui lève la neutralisation du virus HIV par les anticorps monoclonaux B1G6 ou B262.2 in vitro.

Ces peptides constituent des épitopes cryptiques de la $\beta 2$ microglobuline comme décrits précédemment.

Les peptides selon la présente invention sont les suivants :

01 - P1 IQRTPKIQVYSRHPA

(Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-His-Pro-Ala)

02 - P4 FHPSDIEVDLLKDGE

35 (Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Leu-Leu-Lys-Asp-Gly-Glu)

03 - P9 ACRVNHVTLSQPKIV

(Ala-Cys-Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val)

On peut également utiliser une partie plus petite (7 amino-acides) de ces 15 amino-acides qui lève la neutralisation du virus par les anticorps monoclonaux B1G6 ou B2G2.2 :

5 04 - R-7-V RTPKIQV (Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val)

05 - S-7-K SQPKIVK (Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys)

06 - F-7-E FHPSDIE (Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu)

Une structure commune PKI (3 amino acids) semble être le motif responsable ; d'où les modifications d'amino-acides suivantes :

10 07 - TLSRTPKIQV (Thr-Leu-Ser-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val) n° 185

08 - IYLTPKIKV (Ile-Tyr-Leu-Thr-Gln-Pro-Lys-Ile-Lys-Val) n° 186

09 - IQRTPKIQVY (Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr) n° 187

10 - TLSQPKIVKN (Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys-Asn) n° 188

15 11 - IQRTPQJVKW (Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Gln-Ile-Val-Lys-Trp) n° 189

12 - IQRTPNIVKW (Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Asn-Ile-Val-Lys-Trp) n° 190

On peut également introduire une cystéine et un site de glycosylation :

13 - CYNPSDIE (Cys-Tyr-Asn-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu)

20 14 - YCNPEST (Tyr-Cys-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr)

15 - NFLNCYVS (Asn-Phe-Leu-Asn-Cys-Tyr-Val-Ser)

16 - LNCYVSPSD (Leu-Asn-Cys-Tyr-Val-Ser-Pro-Ser-Asp)

Enfin, on peut utiliser les peptides utilisant les différentes variations en fonction des espèces (souris, primates, lapins, cobayes) :

25 17 - KTPQJQV (Lys-Thr-Pro-Gln-Ile-Gln-Val)

18 - FHPPQJE (Phe-His-Pro-Pro-Gln-Ile-Glu)

19 - FHPPHIE (Phe-His-Pro-Pro-His-Ile-Glu)

20 - AEPKTVY (Ala-Glu-Pro-Lys-Thr-Val-Tyr)

21 - SQPKTVY (Ser-Gln-Pro-Lys-Thr-Val-Tyr)

30 22 - ILSRTPKIQV (Ile-Leu-Ser-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val)

Ces peptides de SEQ ID 1 à 22 ne contiennent que le choix préférentiel, il est possible comme cela a été indiqué précédemment de trouver des peptides équivalents.

35 L'exemple 5 décrit un procédé permettant de mettre en évidence les peptides équivalents.

Ces peptides sont, de préférence, liés à un système porteur ; il peut s'agir soit d'un ou plusieurs fragments de protéine liés à l'extrémité N et/ou C terminale desdits peptides afin de permettre notamment une réponse immunitaire, on parlera alors de "protéines conjuguées". Parmi 5 les protéines utilisables il faut citer surtout les albúmines, la KLH ("Keyhole Limpet Hemocyanin") la MAP ("Multiple Antigenic Peptide") ou d'autres protéines connues pour leur pouvoir immunogène. Il est possible également de prévoir des protéines ou des fragments de protéine liés par des liaisons non peptidiques telles que pont disulfure ou liaisons par ion 10 calcium.

Lors de l'étude des différents peptides selon l'invention, il est apparu, bien qu'il ne s'agisse là que d'une théorie qui ne saurait en aucune façon limiter la présente invention, que la structure PKI joue un rôle essentiel. En effet, la proline est un amino-acide qui impose une 15 conformation et qui limite la possibilité d'une configuration peptidique quaternaire. Dans ces conditions KI (Lys, Ile) est fixé dans une position qui est exposée à réagir avec un anticorps.

Dans ces conditions, lors de la construction des protéines support, il conviendra de prévoir de préférence une structure qui laisse 20 accessible la structure PKI.

L'analyse de la structure des régions sélectionnées pour P1, P9 et P10 peut être effectuée par des méthodes telles que la sélection utilisant lalanine pour remplacer chaque amino-acide séparément, notamment dans la région RTPKIQV, afin de mettre en évidence les acides 25 aminés éventuels. On peut également utiliser les techniques mettant en oeuvre la biotinilation de chaque peptide puis la sélection par EIA avec les anticorps pour mettre en évidence la perte de fixation.

Il est ainsi possible de prévoir de conjuguer les épitopes en cause avec des composants non protéiques, par exemple des 30 polysaccharides et/ou des lipides, pour constituer des lipoprotéines présentant des activités vaccinantes améliorées ; là encore, il est possible de prévoir des liaisons covalentes ou non.

Ces différents types de composés peuvent être obtenus, soit 35 par synthèse chimique, soit par des voies recombinantes mettant en oeuvre des techniques connues dans le domaine de la production des protéines recombinantes.

La souplesse des technologies recombinantes permet de réaliser des protéines comportant une pluralité d'épitopes identiques ou différents et susceptibles d'améliorer l'activité du produit final. Il est également possible de prévoir la co-expression de différents éléments 5 entrant dans les compositions selon l'invention.

Selon l'un des aspects de l'invention, le peptide pourra être introduit dans une protéine de structure connue du HIV ; en particulier des constructions dans lesquelles le peptide d'intérêt est inséré dans la région hypervariable de la boucle V3 de la gp120 peuvent être utilisées.

10 La région V3 de la gp120 est le principal domaine de neutralisation de HIV-1 et l'un des déterminants majeurs du tropisme viral. En conséquence, ce type de mutant peut être utile pour étudier la neutralisation de HIV-1 liée au R7V et les modifications de son spectre d'hôte. La haute variabilité de la région V3 de la gp120 parmi les isolats de 15 HIV-1 est une autre raison de la préférence pour cette région. Il a été supposé que le remplacement de la séquence de sept amino-acides dans la région V3 avait de plus fortes chances de conduire à un recombinant viable qu'une mutation dans une autre région plus conservatrice du génome de HIV-1. La protéine recombinante gp120/R7V peut être 20 exprimée en parallèle dans un système convenable d'expression d'une protéine pour obtenir une grande quantité d'immunogène R7V.

L'utilisation de protéines porteuses n'est pas indispensable, il est possible de prévoir éventuellement d'autres systèmes porteurs. Par "système porteur", on entend désigner tout élément qui permet de 25 conduire à un ensemble générant une réponse immunitaire contre le peptide en cause, ou bien qui permet de protéger le peptide d'une élimination, notamment d'une protéolyse rapide.

Les compositions selon l'invention peuvent comporter également des composants augmentant l'immunogénicité des peptides 30 et/ou protéines, notamment des adjuvants d'immunité spécifiques ou non tels que l'adjuvant de Freund, des polysaccharides ou des composés équivalents.

Il s'agit là de procédés qui sont connus dans le domaine de la vaccination.

35 Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées sous une forme quelconque compatible avec la voie d'administration choisie, en

particulier la voie injectable. Toutefois les compositions selon la présente invention pourront être utilisées par d'autres voies, notamment per os ou par voie aérosol, pour induire une protection des muqueuses.

La présente invention concerne également des compositions destinées à être administrées afin d'exprimer *in situ* les peptides et/ou protéines décrites précédemment.

En particulier, la présente invention concerne des cassettes d'expression d'ADN permettant d'exprimer au moins un épitope cryptique tel que défini précédemment, et en particulier le peptide ayant la séquence 1 à 22 et/ou les protéines présentant ces peptides ou des protéines susceptibles de se coupler avec le peptide en cause tel que défini précédemment ou ayant des séquences équivalentes.

Par "séquence équivalente", on entend désigner une séquence codant pour un peptide équivalent tel que cela a été décrit précédemment.

Ces cassettes d'expression d'ADN peuvent, bien entendu, être utilisées soit directement pour une expression *in situ*, soit être utilisées pour produire un peptide ou une protéine utilisable comme cela a été décrit précédemment.

Les systèmes de vaccination mettant en oeuvre des séquences d'ADN sont connus et sont déjà largement décrits dans la littérature.

Il s'agit essentiellement de systèmes permettant l'expression de la protéine antigénique chez l'homme, ou bien l'expression de la protéine antigénique dans une cellule, laquelle est ensuite utilisée pour la vaccination ; lorsque la cellule transformée est une cellule de l'hôte traitée à l'extérieur on parle de traitement *ex vivo*.

Les systèmes d'expression peuvent être très variés, il pourra s'agir notamment de systèmes de type "ADN nu" tels qu'ils sont décrits notamment dans les brevets et demandes de brevet de la société VICAL, WO 90/11092. Dans ce cas, l'ADN codant pour le peptide ou la protéine comportant le peptide est injecté tel quel, cette injection conduit dans un certain nombre de cas à l'expression de la protéine codée.

Les informations contenues dans ces documents sont incluses explicitement dans la présente description par référence.

On pourra utiliser également des systèmes d' "ADN nu" mais comportant leur propre système d'expression notamment afin d'améliorer l'expression.

On pourra également utiliser des systèmes favorisant 5 l'expression, soit par intégration, soit par réPLICATION autonome, notamment des systèmes de type plasmidique ou viral.

Parmi les systèmes d'expression de séquence peptidique que l'on peut mentionner, il faut citer les systèmes utilisant des poxvirus, des adénovirus, des rétrovirus et des virus de type herpès ou d'autres systèmes 10 plus récents tels que les poliovirus.

Parmi les vecteurs, on utilisera de préférence les vecteurs générant une réponse humorale et pour les muqueuses.

D'autres virus peuvent être utilisés afin d'obtenir des vaccins en particulier :

- 15 - les adénovirus comme cela est décrit dans N.R. Rabinovich et al. Science, 1994, 265, 1401-1404 et références citées ;
- les rotavirus comme cela est décrit par Sue E. Crawford, dans Journal of Virology, Sept. 1994, p. 5945-5952 ;
- les poxvirus, notamment la vaccine virus, également les poxvirus 20 animaux comme le canari pox tel que cela est décrit dans les travaux de Paoletti et de Moss ;
- influenza virus tel que décrit dans N.R. Rabinovich et al. (1994).

La technologie permettant d'utiliser les poliovirus à titre de vecteur de vaccination pour différents antigènes est décrite notamment 25 dans Raul Andino et al, Science, 265, 1448-51.

Ce type de construction utilisable dans le cadre de la présente invention permet d'obtenir des vaccins utilisables par voie orale ; pour ce faire on clone la séquence codant pour le ou les peptides éventuellement les protéines porteuses dans un poliovirus, par exemple le virus Sabin 30 atténué, il est possible également d'utiliser un cocktail de virus codant pour différents épitopes.

L'utilisation de plasmides ou de virus pour l'expression de protéines dans les cellules d'un hôte, notamment humain, est connue et ne sera pas explicitée en détail. Les constructions spécifiques dépendent 35 évidemment de l'hôte, de l'épitope et du vecteur retenu.

On peut également utiliser des vaccins cellulaires, c'est-à-dire, par exemple comme cela est proposé dans le cadre de la thérapie génique, de prélever des cellules du patient, les transformer avec des vecteurs tels que décrits précédemment puis les réimplanter afin 5 d'exprimer les protéines *in situ*.

Toutefois, dans le cas d'une vaccination, ce procédé est peu commode. On préférera utiliser des cellules qui peuvent être obtenues en grand nombre, cellules bactériennes ou de levure par exemple, qui expriment la protéine en cause, par exemple en surface, ce qui dans 10 certains cas augmente le pouvoir immunogène de la protéine.

Il est possible, par exemple, d'utiliser les vaccins comportant comme système d'expression *Salmonella* comme cela est décrit dans T.R. Fouts et al., *Vaccine* (1995) 13 in press ; Tacket C.O. et al., *Infect. Immun.* (1992) 60, 536-541 et Hone et al., *J. Chim. Invest.* (1992) 90, 412-420 (pour 15 son évaluation chez l'homme comme support vaccinal).

Ce type de vaccin implique l'utilisation de cellules notamment bactériennes produisant les peptides selon l'invention ou certaines souches d'autres vecteurs de vaccination et décrit dans Chad P Muller, *Immunology Today*. vol. 15 n° 20. 1994, p. 458-459.

Les cellules produisant les peptides ou protéines selon l'invention peuvent être utilisées telles quelles en particulier lorsque les protéines sont exprimées à la surface des cellules et lorsque les cellules sont non toxiques et non pathogènes (souche atténuée ou tuée), mais peut également être utilisé pour produire les peptides et/ou protéines qui 20 seront utilisés après purification.

Ainsi, il peut être intéressant d'obtenir des cellules bactériennes mais également des levures ou des cellules supérieures, cellules animale, végétale ou d'insecte notamment.

Dans le cas de la présente invention, on peut prévoir 30 l'utilisation de vaccins d'origine végétale en utilisant les technologies décrites notamment dans C.J. Arntzel et al. dans *Vaccine* 94.

Les technologies permettant l'expression des peptides ou protéines par des systèmes cellulaires sont connues de même que les techniques de purification.

Comme cela a déjà été mentionné, il est possible d'utiliser les compositions selon l'invention avec des adjuvants améliorant l'activité des séquences d'ADN, notamment des composants constituant des complexes avec l'ADN, tels que les lipides cationiques, ou des structures de type liposome ou microparticule.

5 L'invention concerne également des compositions contenant des anticorps contre les peptides selon l'invention ou des compositions contenant des séquences codant pour des anticorps dirigés contre les peptides selon l'invention.

10 Bien entendu l'utilisation de compositions à base d'anticorps nécessite que ceux-ci soient compatibles avec l'administration à l'être humain ; il peut notamment s'agir d'anticorps humanisés par des techniques connues ou directement exprimés *in situ* à partir de la séquence d'ADN.

15 La présente invention concerne également l'utilisation des anticorps dressés contre les peptides de l'invention et susceptibles de neutraliser le virus HIV, en particulier la présente invention concerne des anti-sérum comportant ce type d'anticorps ou les anticorps obtenus, par exemple par immunopurification, à partir desdits sérum.

20 La présente invention concerne également un procédé de diagnostic, caractérisé en ce qu'on met en évidence dans le sérum d'un patient la présence d'un anticorps dirigé contre l'un des épitopes selon l'invention.

25 Ce procédé peut être mis en oeuvre par toute méthode connue d'identification des anticorps, notamment les méthodes ELISA et RIA et toutes les méthodes qui en dérivent.

30 Toutes ces méthodes reposent de préférence sur la fixation des anticorps en cause sur les peptides antigéniques décrits précédemment puis mise en évidence de cette fixation. Ce diagnostic présente un intérêt considérable, en effet les exemples montrent que les séropositifs dans le cas de HIV qui présentent des anticorps selon l'invention sont dans un très grand nombre de cas non progresseurs, c'est-à-dire qu'ils ne développent pas de SIDA. Dans ce cas le pronostic est très favorable et on peut éviter les traitements lourds. Ceci est particulièrement vrai dans le cas d'une grossesse où la présence de ces anticorps chez la mère (HIV +) semblerait conduire à une non infection du nouveau-né.

La production des compositions selon la présente invention peut être réalisée par des techniques qui sont connues, synthèse de protéine par voie chimique, synthèse d'ADN par synthèse chimique ou multiplication par amplification type PCR. Pour les protéines, celles-ci peuvent également être obtenues par voie recombinante mettant en oeuvre des synthèses appropriées.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

Dans les figures annexées,

- 10 - les figures 1A et 1B représentent les ELISA montrant la réactivité du sérum de lapin immunisé avec R7V-KLH pour différents antigènes,
- la figure 2 représente l'ELISA montrant la réactivité de l'antisérum de lapin immunisé avec notamment la β 2m,
- les figures 3A à 3D représentent l'ELISA entre différents anti-sérum et des peptides sélectionnés,
- 15 - la figure 4 représente l'ELISA de R7V avec différents anticorps anti- β 2m,
- la figure 5 représente l'ELISA de R7V-BSA et β 2m avec des anticorps anti- β 2m et des sérum de lapin,
- 20 - les figures 6 à 13 représentent des diagrammes montrant l'effet des sérum de différents patients sur la neutralisation de différents isolats du virus HIV sur MT4 et PBL.

EXEMPLE 1

Cet exemple permet de mettre en évidence la réponse immunitaire de lapins contre des peptides sélectionnés couplés à une protéine porteuse.

L'antigène peptidique 7AA est couplé à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) et injecté aux lapins en présence d'adjuvant complet de Freund.

Les animaux sont immunisés en présence d'adjuvant complet de Freund à J0, J14, J28, J42 et des saignées d'essai sont effectuées avant l'immunisation aux jours 35, 49, 56 et 70.

Les peptides utilisés sont : RV7-KLH, S7K-KLH et F7E-KLH

Le peptide R7V (RTPKIQV) a été allongé de 2 amino-acides pour permettre le couplage. La structure utilisée comme immunogène est 35 la RTPKIQVGY.

Les anticorps des lapins immunisés 618 ont été mesurés par ELISA, où le peptide couplé à différentes protéines porteuses a été utilisé au fond du puits (soit couplé à la KLH, à la BSA (Sérum Albumine Bovine) ou MAP (Multiple Antigenic Peptide)).

5 Les diagrammes représentent les résultats obtenus à 2 dilutions d100 et d1000, soit une dilution des sérum à 1/100 et 1/1000, ou à temps différents.

La méthode ELISA est appliquée de la façon suivante :

Méthode ELISA

- 10 1) Fixation de l'antigène sur plaque 96 puits (Immilon IV-Dynatech)
 - . Diluer l'antigène dans du tampon carbonate pH 9,6
⇒ (Ag) finale = 1 µg/ml
 - . Distribuer 100 µl/puits, soit 100 ng/puits
 - . Incuber 2 h à 37 °C ou une nuit à 4 °C (en atmosphère humide).
- 15 2) Lavages
 - . 5 lavages avec une solution de PBS/Tween 20 à 0,05 %.
- 3) Saturation des puits
 - . Distribuer 300 µl/puits d'une solution de PBS/sérum de chevel (ou boeuf) à 10 %
 - . Incuber 1 h à 37 °C (en atmosphère humide).
- 20 4) Lavages (identiques au point 2)
- 5) Incubation avec antisérum spécifiques
 - . Diluer le sérum (1/50, 1/100, 1/1000) avec du PBS-10 % sérum de chevel
- 25 6) Distribuer 100 µl/puits et incuber 1 h à 37 °C (en atmosphère humide).
- 6) Lavages (identiques au point 2)
- 7) Incubation avec l'anticorps second (Ig de moutons anti-Ig humaines couplées à la peroxidase)
- 30 8) Diluer l'anticorps second au 2/1000 dans du PBS/sérum de chevel 10 %
- 9) Distribuer 100 µl/puits et incuber 1 h à 37 °C (en atmosphère humide).
- 35 8) Lavages (identiques au point 2)
- 9) Révélation par l'OPD
 - . Dissoudre 10 mg OPD dans 25 ml de tampon phosphocitrate (0,1 M, pH 5,5)

- Ajouter au dernier moment 10 µl H₂O₂
 - Distribuer 100 µl/puits et incuber 30 min à l'obscurité à température ambiante (peut être lu à 405 nm)
 - Arrêter la réaction avec 50 µl H₂SO₄ 12,5 %.
- 5 10) Lecture à 492 nm.

Les figures 1A et 1B montrent des résultats obtenus avec le lapin 618 immunisé avec R7V-KLH.

Une réactivité anti R7V apparaît clairement en différentiel entre R7V-BSA et BSA par rapport à R7V-KLH et KLH où la réactivité anti 10 R7V est masquée par la réponse anti KLH du sérum. Il est à noter que la réactivité anti R7V est plus forte à J68 qu'à J132.

La spécificité de la réaction est plus grande si l'on utilise la protéine BSA.

15 La figure 2 montre encore une bonne reconnaissance de la protéine d'origine, la β2m.

Les anti-sera de lapins immunisés démontrent une réactivité importante avec R7V-BSA ainsi qu'avec les peptides d'origine dénommés P1, P4 et P9 et qui ont été utilisés pour sélectionner R7V, même si la réactivité avec P1 est plus faible (figure 3A - 3D).

20 La figure 4 démontre que la reconnaissance de R7V par B1G6 et B2G2.2 est fonction de la dose et que la reconnaissance de C21-48 est moins bonne, c'est pourquoi on utilisera, de préférence, pour sélectionner des peptides équivalents les AcM B1G6 et B2G2.2.

25 Ces résultats démontrent que l'épitope R7V couplé à la BSA est capable de générer une bonne réponse immunitaire.

EXEMPLE 2

Introduction de R7V dans la boucle V3 de la gp120 de HIV-1 LAV

Construction de provirus recombinant

30 L'objectif de cet exemple est d'introduire la séquence R7V dans la troisième région variable V3 de la gp120 de HIV-1 LAV.

Méthodes

Des virus recombinants chimériques ont été construits par mutagénèse dirigée par PCR. Deux constructions basées sur la séquence R7V et HIV-1 LAV ont été obtenues, dans lesquelles sept amino-acides de la 35 région V3 de la gp120 ont été remplacés par la séquence R7V. Les positions des séquences mutées sont montrées dans le tableau suivant :

HIV-1 LAV (V3) NNNTRKSIRIQRGPGRFVT

R7V	RTPKIQV	(1)	RPL
R7V	RTPKIQV	(2)	PLG

5

Le fragment EcoRI₅₂₇₈-Xhol₈₄₀₁ de HIV-1 LAV cloné dans le vecteur Bluescript a été utilisé comme matrice pour les constructions ultérieures. Dans la première étape, les fragments d'ADN flanqués des amorces contenant le site de restriction BglII à une extrémité et la séquence nucléotidique codant pour R7V à l'autre extrémité ont été synthétisés pour les constructions RPL et PLG par amplification PCR. Les oligonucléotides de mutagénèse utilisés consistaient en une amorce (+) ACACCAAAGATACAAGTTGTTACAAATAGGAAAA et une amorce (-) TTGTATCTTGGTGTCTGGATCCGGATACTTT pour la construction RPL et d'une amorce (+) CGTACACCAAAAATCCAGGTCCAGAGAGGACCA et d'une amorce (-) GATTGGTGTACCGTATTGTTGGGTCT pour la construction PLG. Dans la seconde étape, deux produits de PCR pour chaque construction ont été mélangés et amplifiés en utilisant les amorces contenant les sites de restriction BglII. Les fragments RPL et PLG ont été clivés par l'enzyme BglII et insérés dans le vecteur Bluescript contenant le fragment EcoRI₅₂₇₈-Xhol₈₄₀₁ de HIV-1 LAV, clivé par BglII. Outre la séquence R7V, les amorces d'amplification contenaient des modifications dans la séquence nucléotidique conduisant à l'apparition de nouveaux sites de restriction BamHI et Mlul dans les constructions RPL et PLG, respectivement, sans modifications supplémentaires dans la séquence en amino-acides. Les nouveaux sites de restriction ont été utilisés pour cribler les séquences mutées. Finalement, les fragments EcoRI₅₂₇₈-Xhol₈₄₀₁ de HIV-1 LAV contenant les constructions RPL et PLG ont été insérés dans le plasmide pNL4-3 par recombinaison homologue en utilisant les sites de restriction EcoRI et Xhol. Les constructions ont été vérifiées par analyse par enzyme de restriction.

Transfection de cellules eucaryotes

L'ADN plasmidique de 200 ml de E. coli TG1 a été extrait et purifié par le kit de midpréparation Qjagen. Les cultures semiconfluentes de cellules COS ($\approx 4 \times 10^6$) ont été transfectées avec 7 µg de plasmide par la

technique de coprécipitation au calcium. Le jour suivant, les monocouches de cellules ont été traitées par le glycérol et mises en coculture avec une lignée cellulaire CEM ou avec des lymphocytes sanguins primaires activés par la PHA (PBL, 10^6 cellules/ml) provenant d'un donneur sain. Les 5 cellules CEM ou PBL ont été séparées des COS en monocouches deux jours après et cultivées séparément.

Production de virus

1 ml de surnageant cellulaire libre obtenu à partir des cellules COS ou PBL a été ultracentrifugé et le virus sédimenté à été 10 contrôlé par la réaction standard de la réverse transcriptase. Dans certaines expériences, 100 μ l de surnageant cellulaire a été testé pour la production de la protéine p24gag.

Transfection des cellules COS et coculture avec les CEM

15

	J. post-transf.	Activité Réverse	Transcriptase	(cpm/ml)
		RPL 1	PLG 2	NL 4-3
	5	7282	7730	45838
20	9	3282	5302	326618
	13	382	630	ND
	16	200	300	ND

25

4 10^6 cellules COS ont été transfectées par 7 μ g de plasmide par la technique de coprécipitation au calcium. Les cellules CEM ont été alors ajoutées à raison de $4 \cdot 10^5$ cellules/ml dans un volume final de 5 ml. Après deux jours de coculture les CEM en suspension ont été séparées des COS en monocouche. L'activité de la réverse transcriptase dans les 30 surnageants de culture des CEM est donnée en cpm/ml.

Infection des PBL

	J. post-inf.	Activité Réverse Transcriptase (cpm/ml)		
		RPL 1	PLG 2	NL 4-3
5	4	734	782	20008
	7	202	216	
	10	262	282	
	14	454	262	
	17	204	138	
15			RPL 1 + PBL	PLG 2 + PBL
	1	350	336	276
	24	230	282	296
	27	588	510	620
				980

2,5 10^6 PBL ont été infectées par les surnageants acellulaires
 20 du 19 décembre 1994 obtenus après transfection (tableau 1) à raison de 5000 cpm / 10^6 PBL Au jour 17 post-infection, 2 10^6 PBL nouvellement isolées ont été ajoutées à 2 10^6 PBL infectées (RPL 1 + PBL, PLG 2 + PBL). L'activité de la réverse transcriptase dans les surnageants de culture est donnée en cpm/ml.

25

Transfection des cellules COS et coculture avec des PBL

J. post-transf.	Activité Réverse Transcriptase (cpm/ml)			
	PLG 2-25	PLG 2-30	PLG 2-95	NL 4-3
5				
3	2500	8400	3500	2150
7	446	398	582	53000
10	174	336	306	74000
14	730	834	482	45778
10				
15				
J. post-transf.	Activité R.T. (cpm/ml)			
	RPL 1	PLG 2		
3		20338	22000	
7		682	418	
11		552	466	
20				

4.10⁶ cellules COS ont été transfectées par 7 µg de plasmide par la technique de coprécipitation au calcium. Les cellules PBL stimulées à la PHA ont été alors ajoutées à raison de 10⁶ cellules/ml dans un volume final de 5 ml. Après deux jours de coculture les PBL en suspension ont été séparées des COS en monocouche. L'activité de la réverse transcriptase dans les surnageants de culture des PBL est donnée en cpm/ml.

EXEMPLE 3

Cet exemple a pour but d'utiliser les peptides sélectionnés pour détecter dans le sérum des patients des anticorps potentiellement inhibiteurs de HIV (anticorps anti β2 microglobuline) et en particulier de mettre en évidence la présence d'anticorps protecteurs dans le sérum des patients non progresseurs. Par "patients non progresseurs" ou "NP", on désigne des patients séropositifs depuis plus de 10 ans et n'ayant pas développé de SIDA, en particulier dont le taux de cellules T4 est normal.

Matériel et Méthode

1/ Les peptides utilisés ont été synthétisés et couplés à la BSA par Néosystem (France).

5 2/ Les sérum des patients sont stockés à -20° ou -80° C avant leur utilisation en Elisa.

3/ Les anticorps seconds anti-Ig humaines ou de lapin ont été obtenus de Amersham (France). L'OPD provient de Sigma (France).

ELISA avec les sérum des patients séropositifs

10 1/ Présence d'anticorps anti R7V dans le sérum des patients (titre 1/100 et 1/1000).

2/ Parmi les 46 sérum testés de personnes non progresseurs (pas de réplication virale en culture), 16 sérum sont positifs pour R7V (37%), 27 restent négatifs au 1/100 (63%) et 3 sérum sont indéterminables (Tableau 1).

15 3/ Parmi les 46 patients non progresseurs, 34 ont été testés pour la détection d'anticorps anti peptide : R7V, P1, P4, P9. 14 sérum sont positifs pour au moins un peptide (51.8%) et 13 restent négatifs au 1/100. Quatre sérum n'ont pas pu être classés positif ou négatif (Tableau 2).

Tableau 1 : ELISA R7V avec des sera NP

	NOM	NOMBRE	R7V
5	ARA GE	950	Négatif
	ARG CH	150	Non-déterminé
	AUD PA	1509	Négatif
	BAT AL	134	Négatif
	BAR JE	342	Positif
	BER AL	704	Positif
10	BER SE	1337	Négatif
	BES LA	287	Positif
	BEU PH	5.33	Négatif
	BOR EM	194	Négatif
	BOU NA	5.36	Positif
	BRE FR	20.2.95-5.32	Négatif
15	CAB MI	573	Négatif
	CAU BE	167/1113	Négatif
	CHI OL	353A	Négatif
	COU DA	1531	Négatif
	DIB AN	872	Positif
	DUR JE	937	Positif
20	GAR AI	986	Négatif
	GAS MA	549	Négatif
	GUI JE	60	Positif
	GUI PI	26.1.95-2.9	Négatif
	HAN SO	169/5.31	Positif
	HOL CH	4.25	Négatif
25	IBE JU	6.39	Positif
	IMB PI	327	Non-déterminé
	MAG HE	143	Négatif
	MAN GU	26.1.95-2.8	Négatif
	MAN RO	89	Positif
	MAN XA	730	Négatif
30	MART DO	1412	Négatif
	MAS SU	115	Négatif
	MEN JO	622/1382	Positif
	MON NA	1010	Négatif
	NIC GE	294	Négatif
	OUM NA	1386	Négatif
35	PAR FR	23.1.95-1.7	Négatif
	MEN JO	622/1382	Positif
	POI LI	3.14	Négatif
	PUJ MA	23.1.95-1.2	Négatif
	QUI AL	23.1.95-1.5	Négatif
	RIO EM	3.16	Négatif
40	RIS HE	2.10	Négatif
	ROY CH	5.35	Non-déterminé
	SAL YA	13.3.95	Négatif
	SAN NA	2.11	Négatif
	SAU CH	171/4.27	Positif
	TEM ST	1343	Positif
45	VIA JE	701	Non-déterminé
	ZUM AM	333	Positif

Tableau 2 : ELISA des peptides avec des sera NP

	NOM	NOMBRE	POSITIF/ NEGATIF	PEPTIDES			
				R7V	P1	P4	P9
5	BEU PH	5.33	Négatif				
	BOU NA	5.36	Positif	Pos.	Pos.	Pos.	Nég.
	BRE FR	20.2.95-5.32	Positif	Nég.	Pos.	Pos.	Nég.
	CIF FR	6.38	Négatif (?)				
10	ETC MA	6.45	(?)				
	GEM SA	6.40	(?)				
	GUI JE	60	Positif	Pos.	Pos.	Nég.	Nég.
	GUI PI	26.1.95-2.9	Négatif				
15	HAN SO	169/5.31	Positif	Pos.	Pos.	Nég.	Pos.
	HOL CH	4.25	Négatif				
	IBE JU	6.39	Positif	Pos.	Pos.	Nég.	Nég.
	LED DO	4.23	Positif	Nég.	Pos.	Nég.	Nég.
20	MAN GU	26.1.95-2.8	Négatif				
	MEN JO	622/1382/6.4 3	Positif	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
	MOR JE	5.37	Positif	Nég.	Nég.	Pos.	Nég.
	PAR FR	23.1.95-1.7	Négatif				
25	PAT MA	166	Positif	Nég.	Nég.	Pos.	Nég.
	PIC CH	2.12	(?)				
	POI LI	3.14	Négatif				
	PUJ MA	23.1.95-1.2	Négatif				
30	QUI AL	23.1.95-1.5	Négatif				
	RIO EM	3.16	Négatif				
	RIS HE	2.10	Négatif				
	ROY CH	5.35	Positif	Pos.(?)	Pos.	Nég.	Nég.
35	SAL YA	13/3.95	Négatif				
	SAN NA	2.11	Négatif				
	SAP MA	4.21	(?)				
	SAU CH	171/4.27	Positif	Pos. Pos.(?)	Pos.	Pos.	
	SEN AN	4.28	Positif	Nég.	Pos.	Nég.	Nég.
	TEM ST	5.34	Positif (?)	Pos.	(?)	(?)	(?)
	ZUM AM	333	Positif	Pos.	(?)	(?)	(?)

(?) Non-déterminé

EXEMPLE 4

Les essais suivants ont permis de mettre en évidence chez les patients non progresseurs des anticorps neutralisant différents isolats de HIV, notamment BRU et NDK, les mêmes patients présentant des anticorps 5 anti-R7V. Ceci permet de montrer une bonne corrélation entre le caractère neutralisant et protecteur à l'encontre de HIV des anticorps générés par les traitements selon l'invention.

Matériel et méthodesCulture des cellules MT4

10 Les cellules MT4 sont des cellules immortalisées (CD4 +) très sensibles à l'effet cytopathogène de HIV-1, dérivées à l'origine d'une leucémie T chez l'adulte. Les cellules sont cultivées en présence de milieu RPMI supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de glutamine et 1 % d'antibiotique.

15 Culture des PBL

Les lymphocytes sont stimulés pendant 3 jours avec de la phyto-hémagglutinine P (PHA P) dans du milieu RPMI complet comprenant 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de glutamine, 1 % d'antibiotique, 2 µg/ml de polybren, 20 UI/ml d'Interleukine 2 (IL-2). Les 20 cellules sont ensuite lavées et cultivées à raison de 10⁶ cellules/ml dans du milieu RPMI complet.

Tests de neutralisation

Les sérums sont décomplémentés et filtrés avant leur utilisation dans les tests.

25 Neutralisation sur MT4

Les sérums sont dilués en plaques 24 trous (Costar) dans un volume total de 0,8 ml. les virus HIV-1 BRU (100 µl d'une dilution 10⁻¹ de la solution stock) ou HIV-1 NDK (100 µl d'une dilution 10⁻³ de la solution stock) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 1 h 30 à 37 °C et 5 % 30 CO₂. Les cellules sont ensuite distribuées à raison de 200 µl/trou et 1,5 10⁶ cellules/ml. Trois jours après l'infection, les cultures sont diluées (1/3) avec du milieu RPMI 10 %. L'infection des cellules par les virus HIV-1 est suivie tous les jours sous microscope par l'observation de la formation de syncitia (cellules géantes multinucléées). La neutralisation des virus par 35 les différents sérums est définie par l'absence (-) de syncitia ou très peu de syncitia (+/-) en comparaison de la formation de syncitia induite par les HIV prototypes (+).

Neutralisation sur PBL

Les sérum (50 µl) sont mélangés avec les virus HIV-1 BRU (50 µl d'une dilution 2 10⁻¹ de la solution stock) dans des plaques 96 puits et placés pendant 1 h 30 à 37 °C et 5 % CO₂. Le mélange est alors ajouté à 10⁶ 5 PBL dans des plaques 24 puits (Costar) et la culture est maintenue pendant 3 jours à 37 °C et 5 % CO₂. Les cellules sont ensuite lavées et cultivées à raison de 10⁶ cellules/ml dans des flacons de culture de 25 cm². La production de virus est suivie tous les 3 ou 4 jours par le dosage de l'activité enzymatique de la "Reverse Transcriptase".

10 **Dosage de l'activité "Reverse Transcriptase" (RT)**

Un ml de surnageant de culture centrifugé (1500 rpm; TA, 10 min) est concentré 100 fois par ultracentrifugation (95000 rpm, 4 °C, 5 min) sur un rotor TL 100 (Beckman). Le culot obtenu est repris dans 10 µl 15 de tampon NTE-0,1 % Triton X100. La réaction enzymatique est réalisée dans 50 µl du mélange réactionnel suivant : Tris 50 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 20 mM ; KCl 20 mM ; Dithiothreitol 2 mM ; Oligo dT 12-18 0,25 OD/ml ; poly rA 0,25 OD/ml et 2,5 µCi de ³HdTTP. Après 1 h d'incubation à 37 °C, les produits de la réaction sont précipités avec de l'acide trichloracétique 20 %, filtrés sur des membranes Millipore et la radioactivité β est mesurée. Les résultats 20 sont exprimés en CMP/ml.

Rapport des expériences de neutralisation

Des anticorps dirigés contre le peptide R7V ont été mis en évidence dans les sérum de patients HIV + au moyen d'un ELISA spécifique mis au point par la Demanderesse. On a cherché dans ces 25 sérum l'existence d'une activité neutralisante dirigée contre les deux souches de virus prototype HIV-1 BRU et NDK. Deux tests de neutralisation ont été réalisés, l'un sur une lignée cellulaire MT4 (suivi de la formation de syncitia) et l'autre sur des lymphocytes du sang périphérique sains, PBL (suivi de l'activité enzymatique "Reverse Transcriptase").

Résultats obtenus sur MT4

Parmi les 13 patients testés, une activité sérique neutralisante a été mise en évidence pour 6 d'entre eux (Tableaux 3 à 5) :

- Deux sérum neutralisent HIV-1 NDK :

ZUM AM (ELISA positif)

35 COC PH (ELISA négatif)

- Deux sérum neutralisent HIV-1 BRU :
 - MEC EV (ELISA positif)
 - OUA VE (ELISA négatif)
- Deux sérum neutralisent HIV-1 BRU et HIV-1 NDK :
 - SAU CH (ELISA positif)
 - BUB JE (ELISA positif)

Résultats obtenus sur PBL

L'expérience a été réalisée avec les sérum de MEC EV, SAU CH et BUB JE (1/50) ainsi qu'avec un sérum de séronégatif. Aucune activité neutralisante n'a été détectée pour le sérum SAU CH ainsi que pour le sérum séronégatif. En revanche, une activité neutralisante contre les deux virus prototypes HIV-1 BRU et NDK a été mise en évidence pour les sérum MEC EV et BUB JE (figures 6 à 13).

EXEMPLE 5

15 Méthode permettant de mettre en évidence des peptides équivalents

Effet de peptides sélectionnés sur la neutralisation de HIV-1 NDK par l'anticorps monoclonal anti-β2 B1G6

Protocole

20 Les peptides à une concentration de 100 µg/ml ou 50 µg/ml (40 µl ou 20 µl de la solution mère à 5 mg/ml) sont préincubés avec 5 µg/ml de B1G6 (10 µl d'une solution mère à 1 mg/ml) dans un volume total de 110 µl pendant 2 heures, dans des tubes au bain-marie à 37°C, sous agitation douce. Puis HIV-1 NDK est ajouté (100 µl d'une dilution à 2.10⁻⁴ d'une solution mère et les tubes sont incubés pendant 1 heure à 37°C au bain-marie. Les tubes sont ensuite séparés en deux et chaque 100 µl est ajouté à 10⁶ PBL sur une plaque à 24 puits. Les cellules sont cultivées pendant 3 jours à 37°C sous une atmosphère à 5 % de CO₂. Au jour 3, les cellules sont lavées, mises en culture et propagées pendant au moins 20-25 jours dans un ballon de 25 cm³. La production de virus est suivie tous les 3 ou 4 jours, par dosage de la réverse transcriptase (RT).

Résultats

Les peptides R7V et F7E peuvent annuler l'effet de neutralisation de l'anticorps monoclonal B1G6 sur la production de HIV-1 NDK par les PBL. La séquence du peptide R7V a été modifiée et parmi les 6 nouveaux peptides (185, 186, 187, 188, 189, 190), 3 ont perdu l'effet d'annulation du R7V : les peptides 185, 189 et 190.

Tableau 3

		N D K			Jour / Post infection									
		D4	D5	D6	D7			1/25			1/50			
		1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	
HIV+	ZUM AM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	HAN SO	-	-	-	+	-	-	+	+/-	+/-	+	+	+	
	SAUCH	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
	MEN JO	-	-	-	+/-	-	+/-	+	+/-	+	+	+	+	
	PAT MA	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+	
	COC PH	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+/-	-	
HIV-	SER C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
	DOU S	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	AUB V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NDK 10 ⁻⁴												+	

Tableau 4a

		N D K			Jour / Post infection						
		D4	D5	D6	D7						
		1/50 1/100	1/50 1/100	1/50 1/100	1/50 1/100						
HIV+	ZUM AM	-	+/-	+	+						
	HAN SO	+	+/-	+	+						
	SAU CH	+	+	+	+						
	MEN JO	+	+	+	+						
	MEC EV	+/-	-	+/-	+						
	PAT MA	+/-	+/-	+/-	+						
	COC PH	+/-	-	+/-	-						
HIV-	AUB V	+	+/-	+	+						
	NDK 10 ⁻⁴										

Tableau 4b

		Jour / Post infection							
		D4		D5		D6		D7	
		1/50	1/100	1/50	1/100	1/50	1/100	1/50	1/100
HIV+	ZUM AM	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+
	HAN SO	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+
	SAU CH	+	+	+	+	+	+	+	+
	MEN JO	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	MFC EV	-	-	-	-	-	-	-	-
	PAT MA	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	COC PH	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+
HIV-	AUB V	+	+	+	+	+	+	+	+
	BRU 10 ⁻²								+

Tableau 5a

		N D K		Jour / Post infection						D7				
		D4	D5	D6	D7	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100
HIV+	ZUM AM	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+
	MEC EV	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	+
	SAUCHI	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	OUA VE	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	+
	QUI AL	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+
	BUB JE	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	+
	PUJ MA	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
	SEN AN	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+
	RIO EM	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+
HIV-	AUB V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NDK 10 ⁴		+/-								+			+

Tableau 5b

		Jour / Post infection														
		D4					D5			D6			D7			
		1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100
HIV+	ZUM AM	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MEC EV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	SAU CL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	OUA VE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	QUI AL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	BUB JE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	PUJ MA	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
	SEN AN	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
	RIO EM	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
HIV-	AUB V	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BRU 10 ⁻²															+

EXEMPLE 6Corrélation entre la présence d'anticorps anti-R7V et la progression de la maladie

5 Des échantillons de sérums de 90 patients infectés par le HIV sont utilisés. Ils se répartissent comme suit : 28 patients asymptomatiques depuis plus de 3 ans, 24 survivants à long terme et 38 patients atteints du Sida. Un groupe de contrôle constitué de 69 donneurs volontaires séronégatifs a été obtenu à partir de la banque du sang.

10 Le comptage des lymphocytes a été effectué par immunofluorescence indirecte et analysé par Epic Profile (Coultronics, Margency, France). Les taux sériques de β 2m ont été mesurés par immunodiffusion (El Nanorid Kit). Les taux d'antigène p24 ont été testés par le Kit de détection p24 de Coulter (Coultronics, Margency, France).

15 Les concentrations sériques en anticorps anti-R7V sont détectées par ELISA. Les résultats sont exprimés en concentration d'équivalent d'anticorps monoclonaux B1G6 en μ g/ml.

Essai de neutralisation

20 Les sérums humains sont décomplémentés et dilués jusqu'à 200 μ g/ml ou 100 μ g/ml d'équivalent B1G6. 50 μ l de HIV contenant 100 TCID₅₀ sont préincubés avec 50 μ l de sérum dilué (volume total 100 μ l) dans une plaque à 96 trous à 37° C et 5% de CO₂ pendant 90 min. Le mélange réactionnel contenant les virus et le sérum est dilué deux fois après addition de 8×10^4 cellules MT4 (dilution finale des sérums de 1/120 à 1/20) et trois fois à nouveau trois jours après l'infection. L'effet fusogénique du HIV dans les lignées MT4, c'est-à-dire la formation de syncytia comme indicateur de l'infection par le virus, est suivi pendant 7 jours dans les trous de culture. L'activité Reverse Transcriptase est mesurée dans 400 μ l de surnageant dépourvu de cellule, 7 jours après l'infection.

La valeur moyenne des taux d'anticorps anti-R7V est calculée pour chaque patient et pour chaque groupe. Les sérums de personnes infectées par le HIV contiennent des anticorps anti-R7V et les sérums HIV séropositifs montrent des concentrations significativement plus élevées
5 en anticorps anti-R7V que celles des sérums séronégatifs. Les taux d'anticorps anti-R7V exprimés en équivalent B1G6 s'échelonnent de 35 à 2558 µg/ml (n = 90) et de 27 à 1790 µg/ml (n = 69), respectivement dans les groupes infectés par HIV et dans les groupes non infectés par HIV.

On a ensuite classé le groupe des patients HIV en trois
10 catégories selon leur statut clinique : groupe des non-progresseurs (NP) constitué des patients séropositifs pour HIV depuis une longue période et suivis au Laboratoire depuis plus de 3 ans sans symptômes du Sida ; le groupe des survivants à long terme (LTS) est constitué des personnes présentant le Sida depuis une longue période et finalement, un groupe
15 progresseur est constitué des personnes atteintes du Sida avec un mauvais pronostic.

Les anticorps anti-R7V sont significativement augmentés dans le groupe asymptomatique (de 91 à 2558 µg/ml) par rapport au groupe progresseur (de 35 à 630 µg/ml) ($p = 0,001$) alors qu'on n'observe pas de
20 différence significative par rapport au groupe LTS (de 59 à 1864 µg/ml). De même le groupe LTS présente des taux d'anti-R7V plus élevé que le groupe progresseur ($p = 0,004$). Comparé aux sujets sains, il n'existe pas de différence du taux d'anticorps anti-R7V dans le groupe progresseur.

Dans le groupe progresseur, une distinction nette peut être
25 faite en fonction du taux d'anticorps anti-R7V entre les sujets qui décèdent peu de temps après leur dernière visite au Laboratoire (de 35 à 508 µg/ml, n = 23) et ceux encore vivants mais malades (de 77 à 586 µg/ml, n = 14) ($p < 0,03$).

Une étude suivie longitudinale n'a pas pu établir de
30 corrélation entre les taux d'anticorps anti-R7V et d'autres paramètres biologiques comme la numération totale des lymphocytes, les cellules CD4, CD8, la p24 et la β2m circulant.

Il apparaît que le taux de R7V est stable dans le temps chez les patients NP, alors qu'il fluctue chez les patients LTS.

Afin de lier le test ELISA avec une activité biologique du sérum du patient, un test de neutralisation a été effectué avec deux virus non apparentés, la souche HIV-1 LAV et la souche hautement cytopathogène HIV-1 NDK, sur des cellules MT4 indicateur. Les dilutions du sérum ont été ajustées afin d'obtenir 5 µg d'équivalent B1G6 dans le mélange de neutralisation. Cette concentration avait été définie comme optimum pour la neutralisation de l'infection par les anticorps B1G6. Comme on le voit dans le tableau 5, 17 des 18 sera sélectionnés empêchent l'infection de cellules MT4 aussi bien par NDK que par LAV. Pour parvenir à 5 µg d'équivalent B1G6 en culture, 13 des 18 sera testés nécessitaient une dilution inférieure à 1/50. Afin d'éliminer des activités non spécifiques dues à d'éventuels composants sériques, ces sérums à faible taux en équivalent B1G6 ont été dilués au 1/100 et utilisés dans l'essai de neutralisation. La quantité d'équivalent B1G6 en culture était alors inférieure à 5 µg (de 2,5 µg/ml à 0,3 µg/ml). Neuf des 14 sérums (64%) neutralisaient encore les deux souches HIV, LAV et NDK, à une dilution au 1/100. Trois sérums de donneurs sains utilisés comme contrôles, ne montrent aucune activité neutralisante.

20

Tableau 5

	Dilutions du sérum à 5 µg d'équivalent B1G6 dans l'essai	:	Nombre de sérums qui neutralisent les deux souches de HIV/sera total testé
25	dilution \geq 1/50	:	5/5
	1/50 > dilution \geq 1/20	:	10/11
30	dilution < 1/20	:	2/2
	TOTAL	:	17/18

LISTE DE SEQUENCES

Information pour la SEQ ID N° 1

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 15 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 1

Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr-Ser-Arg-His-Pro-Ala

Information pour la SEQ ID N° 2

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 15 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 2

Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu-Val-Asp-Leu-Leu-Lys-Asp-Gly-Glu

Information pour la SEQ ID N° 3

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 15 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 3

Ala-Cys-Arg-Val-Asn-His-Val-Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val

Information pour la SEQ ID N° 4

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 4

Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val

Information pour la SEQ ID N° 5

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 5

Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys

Information pour la SEQ ID N° 6

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 6

Phe-His-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu

Information pour la SEQ ID N° 7

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 7

Thr-Leu-Ser-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val

Information pour la SEQ ID N° 8

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 8

Ile-Tyr-Leu-Thr-Gln-Pro-Lys-Ile-Lys-Val

Information pour la SEQ ID N° 9

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 9

Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val-Tyr

Information pour la SEQ ID N° 10

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 10

Thr-Leu-Ser-Gln-Pro-Lys-Ile-Val-Lys-Asn

Information pour la SEQ ID N° 11

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 11

Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Gln-Ile-Val-Lys-Trp

Information pour la SEQ ID N° 12

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 12

Ile-Gln-Arg-Thr-Pro-Asn-Ile-Val-Lys-Trp

Information pour la SEQ ID N° 13

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 8 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 13

Cys-Tyr-Asn-Pro-Ser-Asp-Ile-Glu

Information pour la SEQ ID N° 14

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 14

Tyr-Cys-Asn-Pro-Glu-Ser-Thr

Information pour la SEQ ID N° 15

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 8 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 15

Asn-Phe-Leu-Asn-Cys-Tyr-Val-Ser

Information pour la SEQ ID N° 16

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 9 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 16

Leu-Asn-Cys-Tyr-Val-Ser-Pro-Ser-Asp

Information pour la SEQ ID N° 17

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 17

Lys-Thr-Pro-Gln-Ile-Gln-Val

Information pour la SEQ ID N° 18

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 18

Phe-His-Pro-Pro-Gln-Ile-Glu

Information pour la SEQ ID N° 19

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 19

Phe-His-Pro-Pro-His-Ile-Glu

Information pour la SEQ ID N° 20

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 20

Ala-Glu-Pro-Lys-Thr-Val-Tyr

Information pour la SEQ ID N° 21

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 7 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 21

Ser-Gln-Pro-Lys-Thr-Val-Tyr

Information pour la SEQ ID N° 22

TYPE : acide aminé

LONGUEUR : 10 acides aminés

CONFIGURATION : linéaire

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° 22

Ile-Leu-Ser-Arg-Thr-Pro-Lys-Ile-Gln-Val

39/1

LEGENDE DES FIGURES

LEGENDE DE LA FIGURE 1A

5

<input type="checkbox"/> J63 d100
<input checked="" type="checkbox"/> J132 d100

10 LEGENDE DE LA FIGURE 1B

<input checked="" type="checkbox"/> J53 d100
<input type="checkbox"/> J132 d100

15

LEGENDE DE LA FIGURE 2

ELISA avec l'antisérum de lapin pour R7V ou β 2m

20 lapin 618 (immunisation avec R7V-KLH) dilution sérum 1/100

<input checked="" type="checkbox"/> IMMUN SERUM
<input type="checkbox"/> J63 p
<input type="checkbox"/> J132 p

25

LEGENDE DE LA FIGURE 3A

30

ELISA avec de l'antisérum de lapin sur des puits revêtus de peptide

<input type="checkbox"/> lapin 618 immunisé avec R7V
<input checked="" type="checkbox"/> lapin 621 immunisé avec F7E
<input type="checkbox"/> lapin 624 immunisé avec S7K

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

39/2

LEGENDE DE LA FIGURE 3B

ELISA avec des sera de lapins immunisés

5

<input type="checkbox"/>	lapin 618
<input checked="" type="checkbox"/>	lapin 619
<input type="checkbox"/>	lapin 620

10

LEGENDE DE LA FIGURE 3C

ELISA avec des sera de lapins immunisés

15

<input type="checkbox"/>	lapin 621
<input checked="" type="checkbox"/>	lapin 622
<input checked="" type="checkbox"/>	lapin 623

20

LEGENDE DE LA FIGURE 3D

ELISA avec des sera de lapins immunisés

25

<input type="checkbox"/>	lapin 624
<input checked="" type="checkbox"/>	lapin 625
<input checked="" type="checkbox"/>	lapin 626

30

LEGENDE DE LA FIGURE 4

ELISA avec B1G6, C21.43, B2G2.2 mAb pour R7V

35

<input type="checkbox"/>	B1G6
<input checked="" type="checkbox"/>	C21.43
<input checked="" type="checkbox"/>	B2G2.2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

39/3

LEGENDE DE LA FIGURE 5

ELISA POUR R7V-BSA OU β 2

5



10

LEGENDE DE LA FIGURE 6

NEUTRALISATION DE HIV-1 BRU-1 PAR LE SERUM MEC EV (1/50) SUR PBL

15

- ▲ — MEC EV 50
- ▲ — MEC EV 50'
- ★ — BRU
- ★ — BRU'

20

LEGENDE DE LA FIGURE 7

NEUTRALISATION DE HIV-1 BRU-1 PAR LE SERUM DE
25 BUB JE (1/50) SUR PBL

30

- ▲ — BUB JE 50
- ▲ — BUB JE 50'
- ★ — BRU
- ★ — BRU'

39/4

LEGENDE DE LA FIGURE 8

EFFET DU SERUM SAU CH (1/50) SUR LA PRODUCTION
DE HIV-1 BRU-1 SUR PBL

5

- △— SAU CH 50
- △— SAU CH 50'
- ★— BRU
- ★— BRU'

10

LEGENDE DE LA FIGURE 9

EFFET D'UN SERUM DE PATIENT HIV- SUR LA PRODUCTION DE HIV-1 SUR PBL

15

- △— SNS
- △— SNS'
- ★— BRU
- ★— BRU'

20

LEGENDE DE LA FIGURE 10

25 NEUTRALISATION DE HIV-1 NDK PAR LE SERUM MEC EV (1/50) SUR PBL

30

- △— MEC EV 50
- △— MEC EV 50'
- ★— NOK 5-4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

39/5

LEGENDE DE LA FIGURE 11

NEUTRALISATION DE HIV-1 NDK PAR LE SERUM BUB JE (1/50) SUR PBL

5

- △— BUB JE 50
- △— BUB JE 50'
- ★— NOK 5-4

10

LEGENDE DE LA FIGURE 12

EFFET DU SERUM SAU CH (1/50) SUR LA PRODUCTION DE HIV-1 NDK SUR PBL

15

- △— SAU CH 50
- △— SAU CH 50'
- ★— NOK 5-4

20

LEGENDE DE LA FIGURE 13

EFFET D'UN SERUM DE PATIENT HIV- SUR LA PRODUCTION
25 DE HIV-1 NDK SUR PBL

- △— SN5 50
- △— SNS 50'
- ★— NOK 5-4

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

REVENDICATIONS

- 1) Vaccin destiné au traitement et/ou à la prévention de maladies d'origine infectieuse, l'agent infectieux ayant au moins une phase intracellulaire chez l'hôte lors de son cycle de multiplication, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un épitope cryptique d'un élément cellulaire emporté par un agent infectieux intracellulaire lors de son passage à l'extérieur de la cellule et qui est dévoilé par l'agent infectieux.
- 2) Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent infectieux est constitué par un parasite intracellulaire ou un virus à enveloppe.
- 3) Vaccin selon la revendication 2, caractérisé en ce que le virus est choisi parmi HIV, CMV et HPV.
- 4) Composition destinée au traitement ou à la prévention des infections à HIV, caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif au moins un peptide correspondant aux séquences id n° 1 à 22 ou une séquence équivalente.
- 5) Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le peptide est lié à un système porteur.
- 6) Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que le système porteur est constitué d'un ou plusieurs fragments de protéine liés à l'extrémité N ou C terminale du peptide par une liaison peptidique.
- 7) Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le système porteur est lié au peptide par une liaison non peptidique.
- 8) Composition selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que le peptide a la séquence R7V.
- 9) Composition selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisée en ce qu'elle comporte plusieurs peptides.
- 10) Composition selon l'une des revendications 4 à 9, caractérisée en ce que le système porteur est choisi parmi les albumines, la KLH et la MPA.
- 11) Composition selon l'une des revendications 4 à 10, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre les adjuvants d'immunité non spécifiques.

12) Composition destinée au traitement et à la prévention des infections à HIV, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'ADN codant pour un peptide selon l'une des séquences id n° 1 à 22 ou une séquence équivalente.

13) Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que la séquence d'ADN code pour un peptide portant la séquence peptidique séquence id n° 1 à 22 ou une séquence équivalente.

14) Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que la séquence d'ADN est précédée de la séquence assurant son expression dans une cellule hôte.

15) Composition selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que la séquence d'ADN est portée par un vecteur d'expression.

16) Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que le vecteur d'expression est en réplication autonome.

17) Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que le vecteur d'expression est un vecteur d'intégration chromosomique.

18) Composition selon l'une des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que le vecteur d'expression est un plasmide bactérien.

19) Composition selon l'une des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que le vecteur d'expression est constitué de tout ou partie d'un virus défectif et/ou non pathogène.

20) Composition selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que le peptide est exprimé dans une cellule hôte.

21) Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite cellule est une cellule eucaryote ou végétale.

22) Anticorps dirigés contre un peptide utilisé dans l'une des compositions selon l'une des revendications 1 à 21.

23) Composition comportant au moins un anticorps selon la revendication 22.

24) Procédé de diagnostic de patients non progresseurs, caractérisé en ce que l'on détecte par un test immunologique la présence d'anticorps selon la revendication 19.

25) Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que le test immunologique est un test ELISA ou RIA.

1 / 17

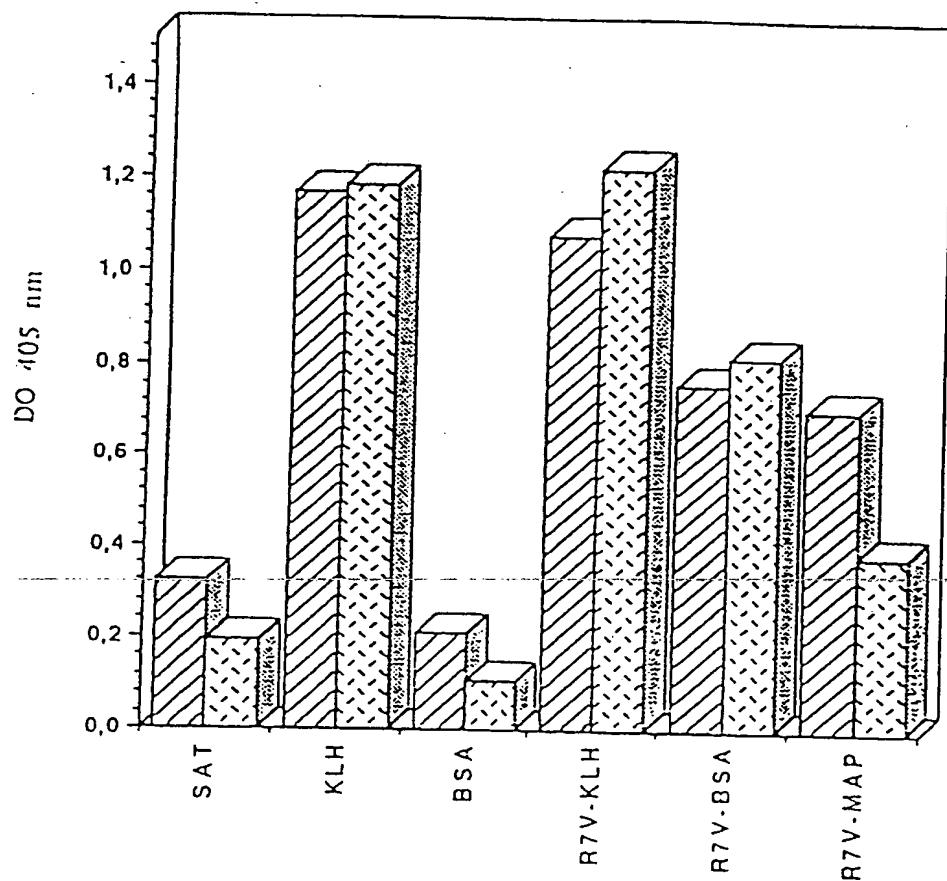


FIG. 1A

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

2 / 17

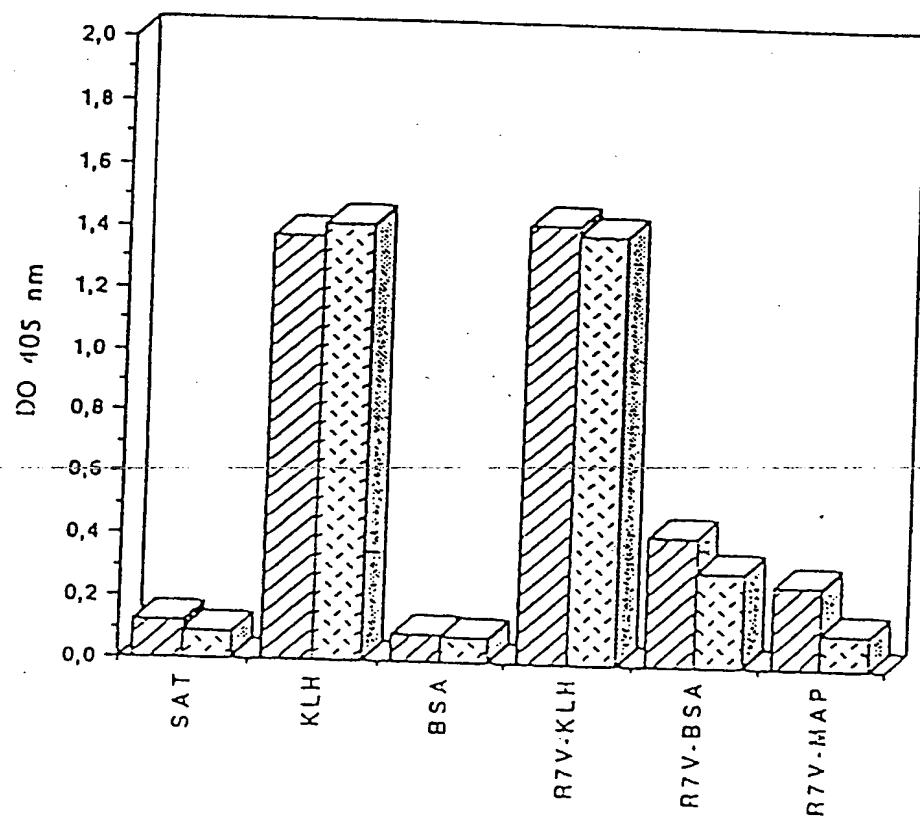


FIG. 1B

3 / 17

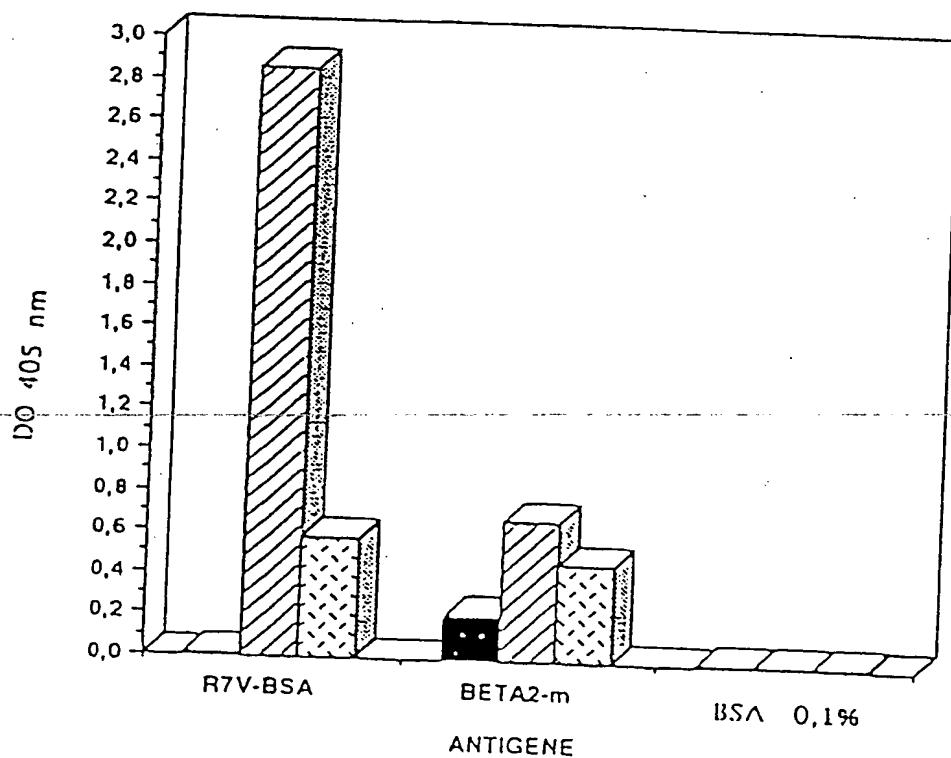


FIG. 2

4 / 17

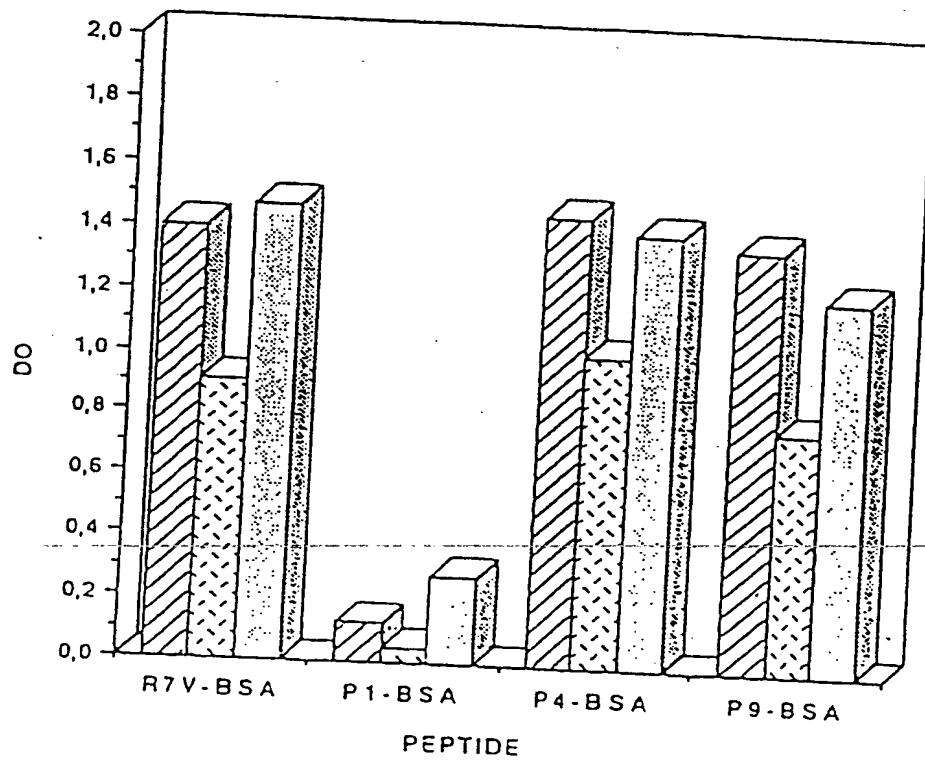


FIG. 3A

FEUILLE DE REMplacement (REGLE 26)

5 / 17

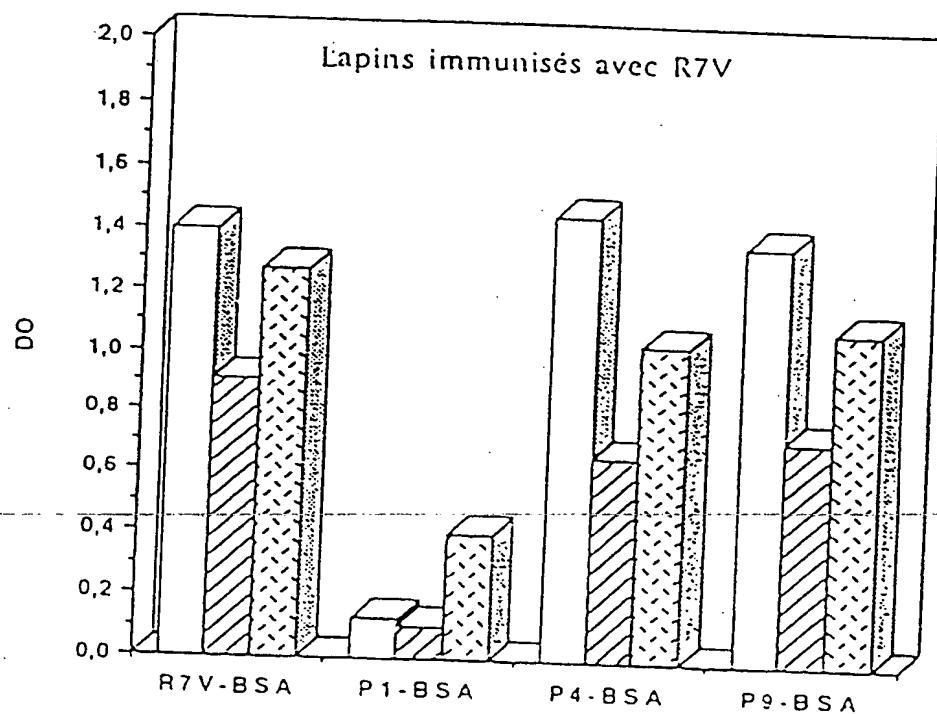


FIG. 3B

6 / 17

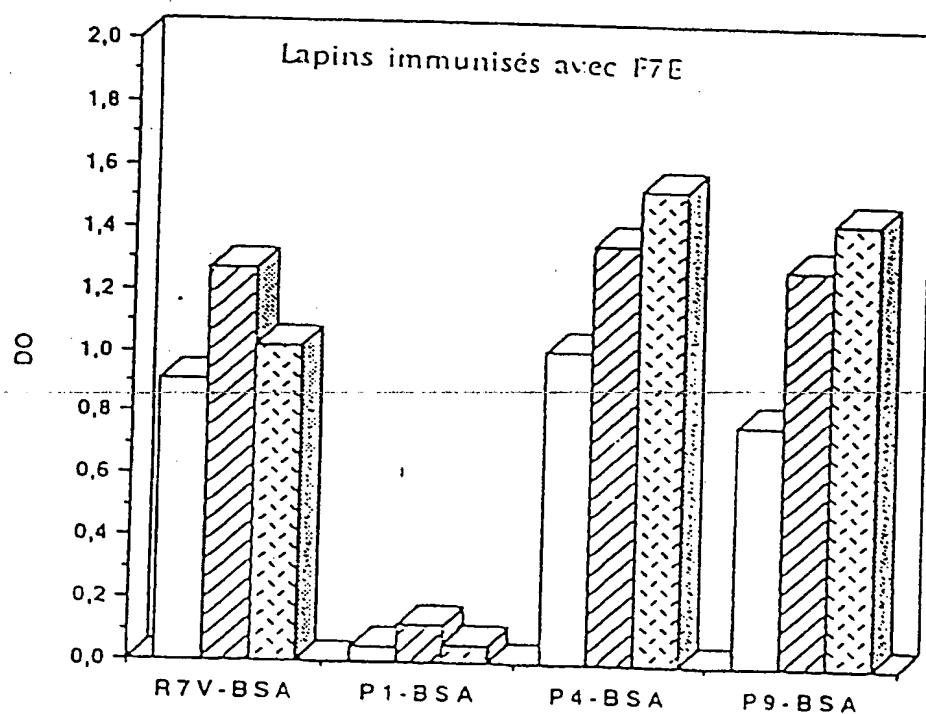


FIG. 3C

7 / 17

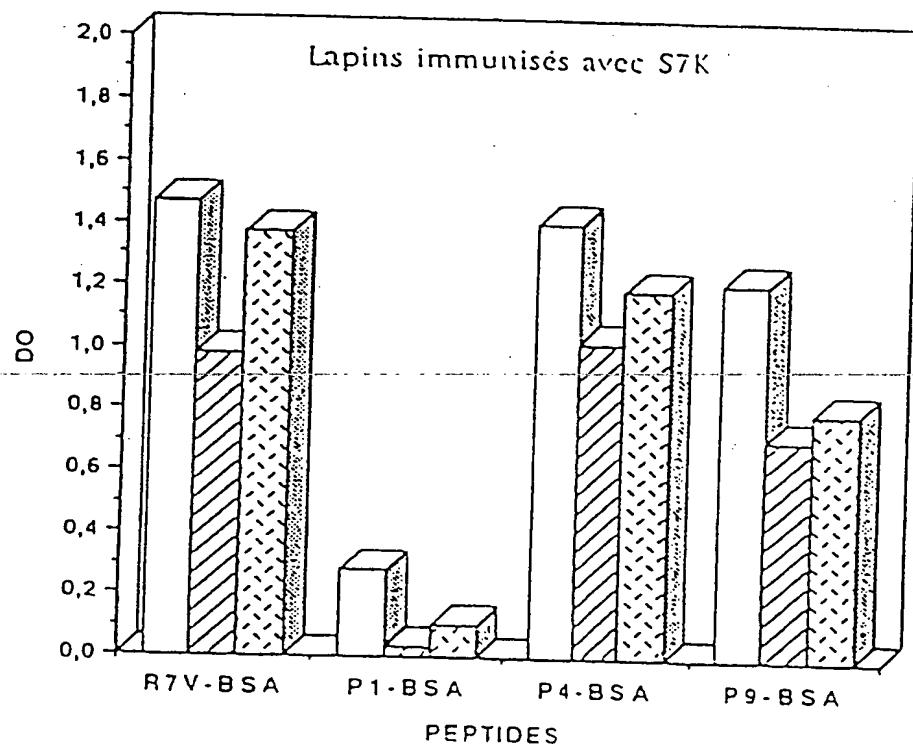


FIG. 3D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8 / 17

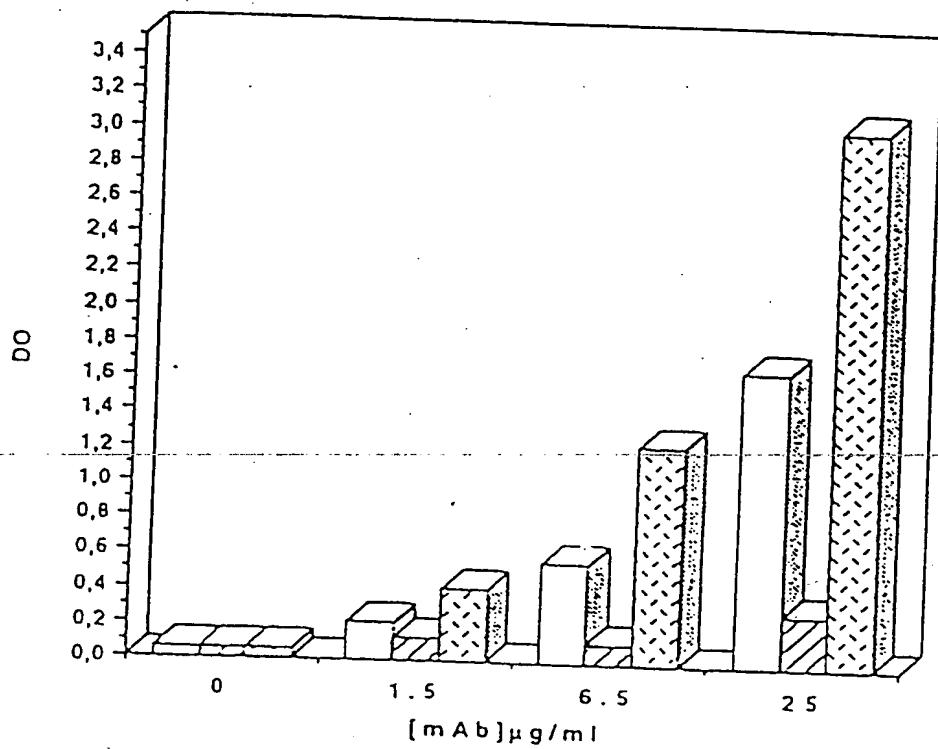


FIG. 4

9 / 17

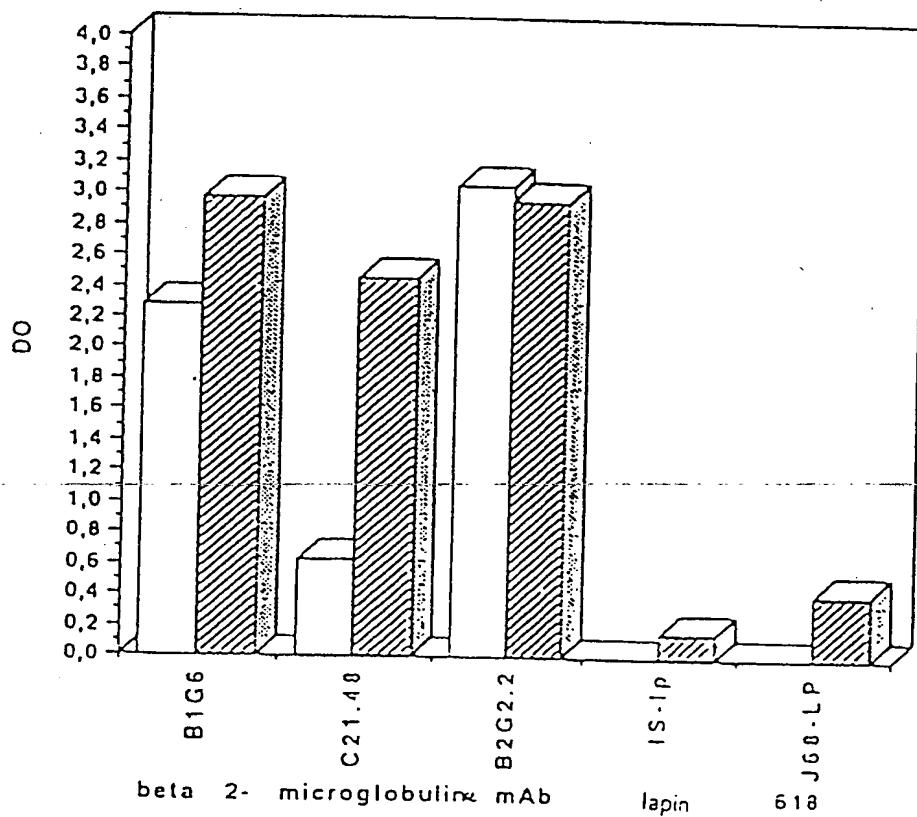


FIG. 5

10/17

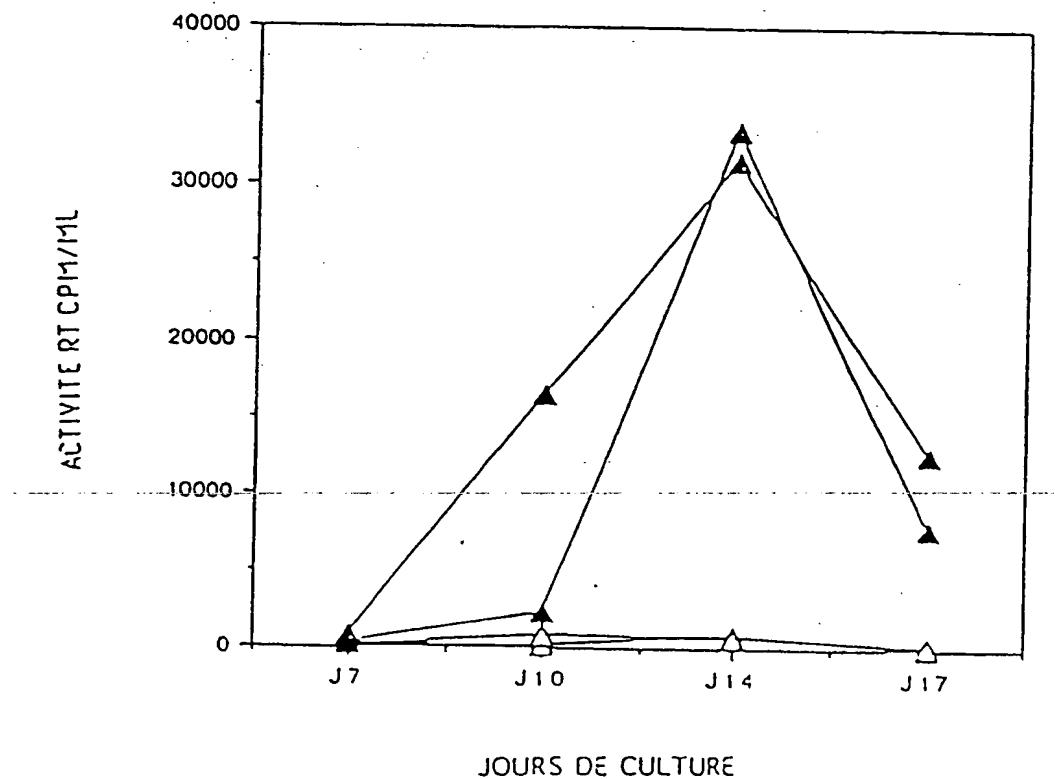


FIG. 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/17

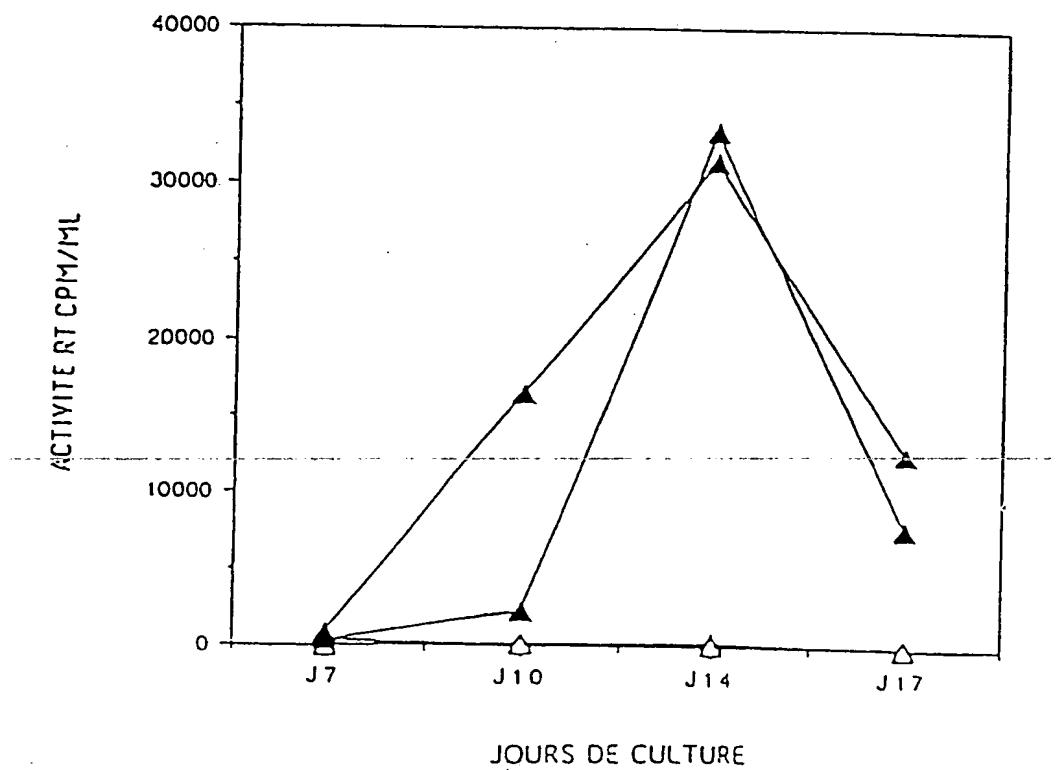


FIG. 7

12/17

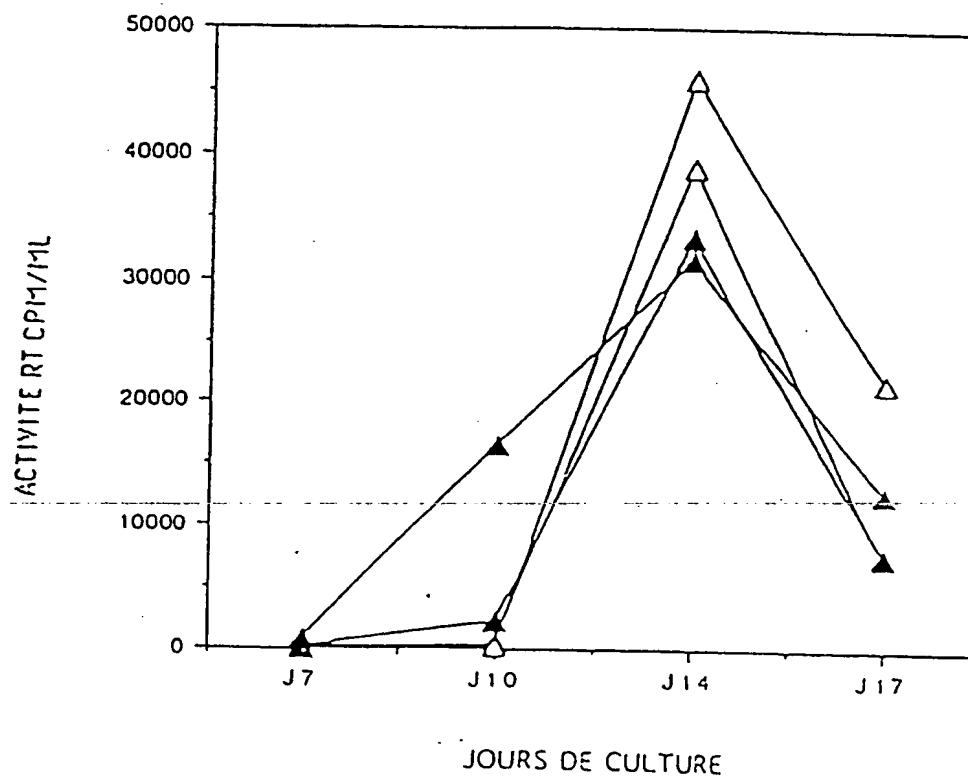


FIG. 8

13 / 17

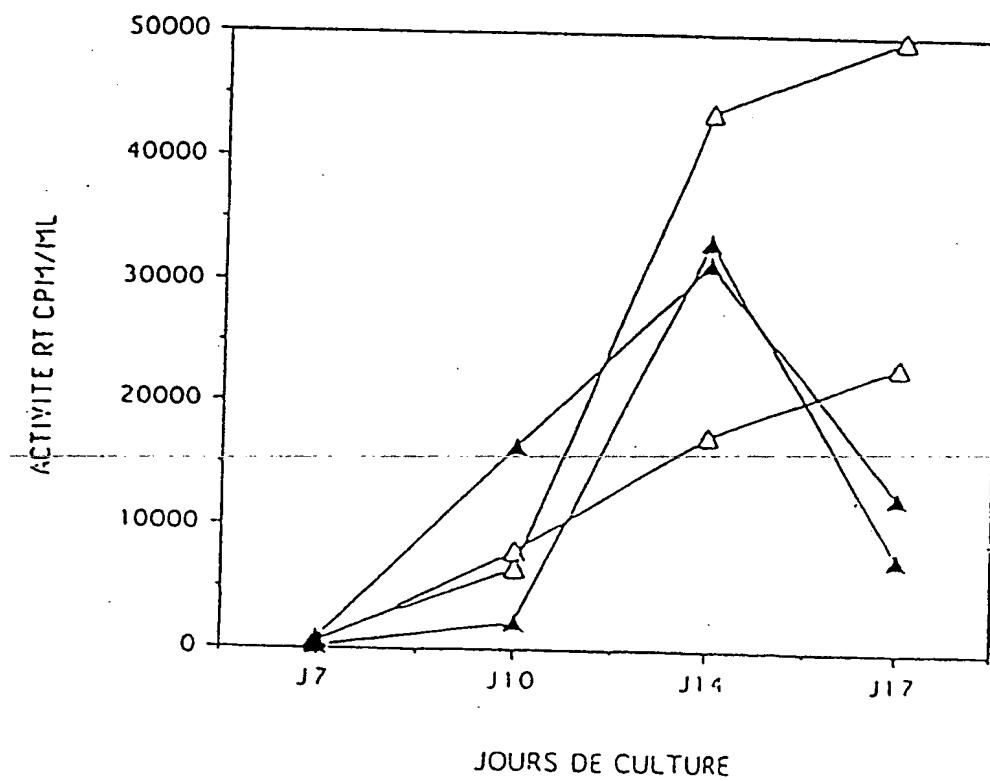


FIG. 9

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

14 / 17

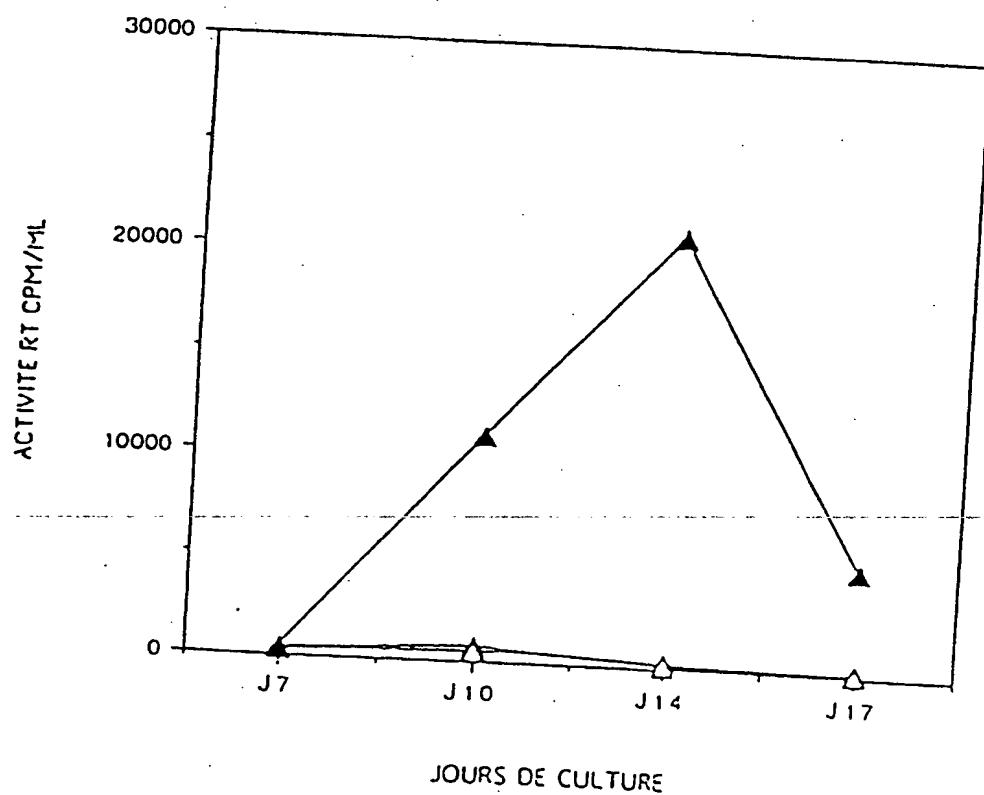


FIG. 10

15 / 17

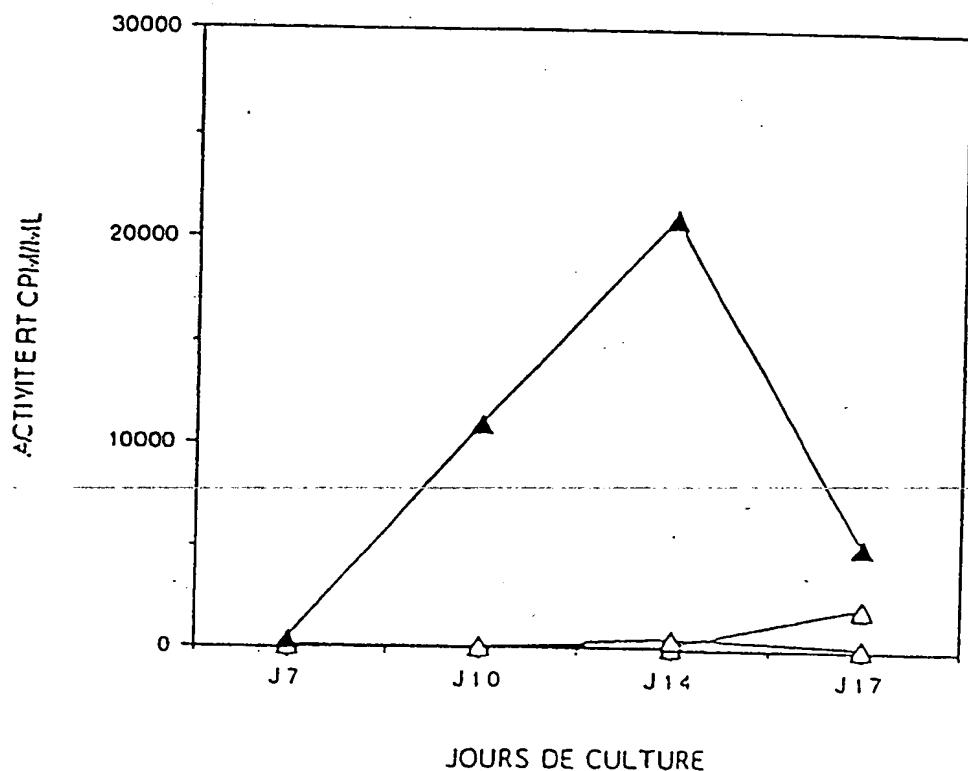


FIG. 11

16/17

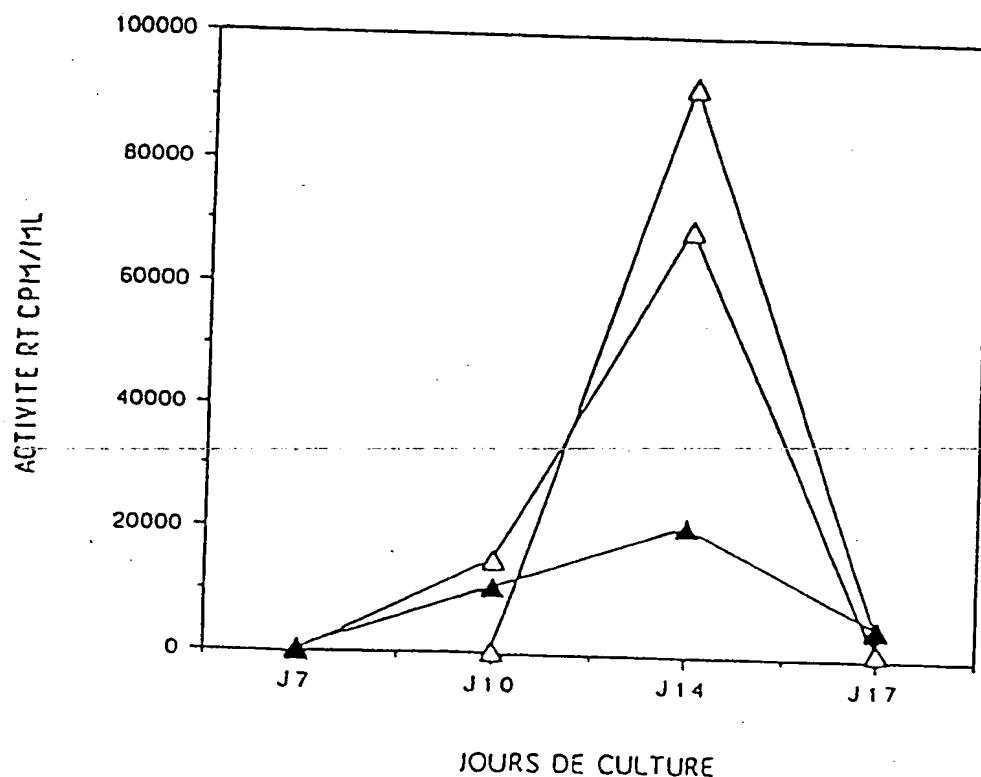


FIG.12

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

17 / 17

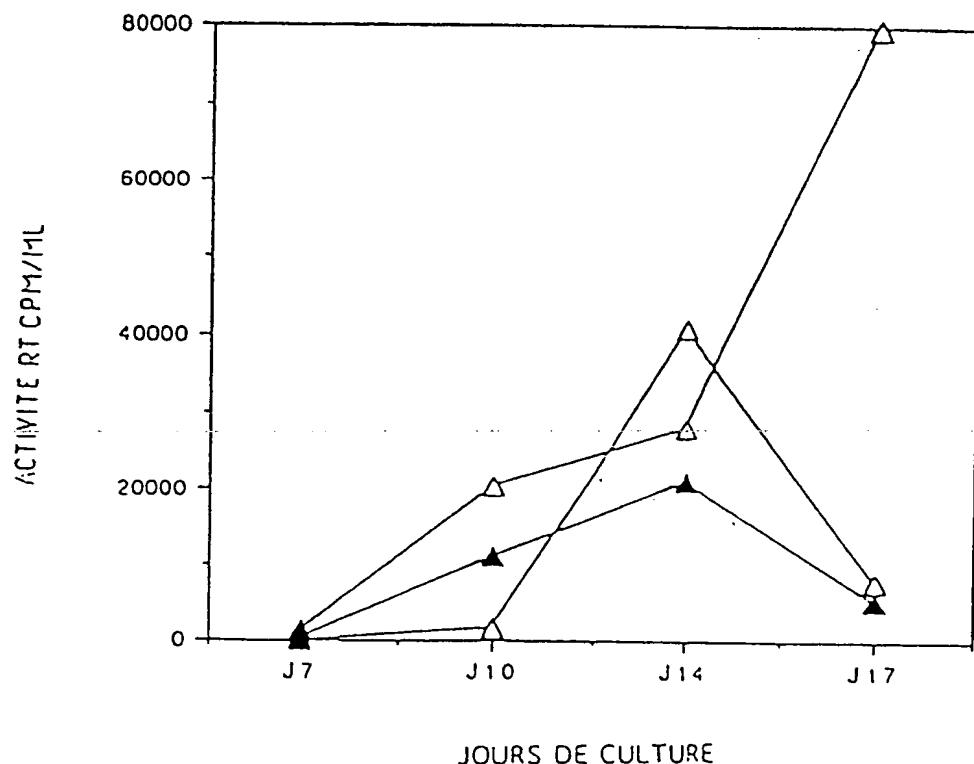


FIG. 13



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, A61K 39/21, 39/385, 39/395, C07K 16/28, G01N 33/577		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/02344 (43) Date de publication internationale: 23 janvier 1997 (23.01.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01006 (22) Date de dépôt international: 28 juin 1996 (28.06.96)		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Données relatives à la priorité: 95/07914 30 juin 1995 (30.06.95) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): CHERMANN, Jean-Claude [FR/FR]; 8 Les Ombrées, 1, route de la Treille, F-13011 Marseille (FR). LE CONTEL, Carole [FR/FR]; 172, La Canebière, F-13001 Marseille (FR). GALEA, Pascale [FR/FR]; La Rouvière, Bâtiment D1, 83, boulevard du Redon, F-13009 Marseille (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 6 mars 1997 (06.03.97)	

(54) Title: VACCINE FOR INFECTIOUS AGENTS, COMPOSITION FOR TREATING AND PREVENTING HIV INFECTIONS

(54) Titre: VACCIN CONTRE DES AGENTS INFECTIEUX, COMPOSITION POUR LE TRAITEMENT ET LA PREVENTION DES INFECTIONS A-HIV

(57) Abstract

A vaccine for treating and/or preventing infectious diseases where the infectious agent has at least one intracellular phase in the host during its multiplication cycle, is disclosed. The vaccine comprises at least one cryptic epitope of a cellular element that is carried along by an intracellular infectious agent as it leaves the cell, and revealed by said infectious agent. A composition for treating and/or preventing HIV infections, antibodies to a peptide of interest, and a diagnostic method, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un vaccin destiné au traitement et/ou à la prévention de maladies d'origine infectieuse, l'agent infectieux ayant au moins une phase intracellulaire chez l'hôte lors de son cycle de multiplication, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un épitope cryptique d'un élément cellulaire emporté par un agent infectieux intracellulaire lors de son passage à l'extérieur de la cellule et qui est dévoilé par l'agent infectieux. Elle concerne également une composition destinée au traitement ou à la prévention des infections à HIV, des anticorps dirigés contre un peptide d'intérêt et un procédé de diagnostic.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

PCT/FR 96/01006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 A61K39/21 A61K39/385 A61K39/395 C07K16/28
G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 24290 A (BRITISH BIOTECHNOLOGY LIMITED) 27 October 1994 see page 25 - page 27 ---	1
X	WO 92 18630 A (FONDATION NATIONALE DE TRANSFUSION SANGUINE) 29 October 1992 see page 11 - page 12 ---	1-5
X	WO 94 01130 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 20 January 1994 see page 20 ---	1-3
A	WO 93 14126 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 22 July 1993 see the whole document ---	1-25 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

*'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

28 January 1997

Date of mailing of the international search report

04.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventory at Application No

PCT/FR 96/01006

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>CELLULAR PHARMACOLOGY 3 (2). 1996. 68-73, XP000616506 LE CONTEL C ET AL: "Identification of the beta-2m derived epitope responsible for neutralization of HIV isolates." see the whole document</p> <p>-----</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern	Application No
	PCT/FR 96/01006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9424290	27-10-94	AU-A-	6435294	08-11-94
		AU-A-	6435394	08-11-94
		EP-A-	0692027	17-01-96
		EP-A-	0693125	24-01-96
		WO-A-	9424280	27-10-94
WO-A-9218630	29-10-92	FR-A-	2675508	23-10-92
WO-A-9401130	20-01-94	AU-A-	4576293	31-01-94
		CA-A-	2140150	20-01-94
		EP-A-	0650369	03-05-95
		JP-T-	7508984	05-10-95
WO-A-9314126	22-07-93	AU-A-	3359693	03-08-93
		CA-A-	2128211	22-07-93
		EP-A-	0623147	09-11-94
		JP-T-	7505613	22-06-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/01006

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 A61K39/21 GOIN33/577

A61K39/385 A61K39/395 C07K16/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 24290 A (BRITISH BIOTECHNOLOGY LIMITED) 27 Octobre 1994 voir page 25 - page 27 ---	1
X	WO 92 18630 A (FONDATION NATIONALE DE TRANSFUSION SANGUINE) 29 Octobre 1992 voir page 11 - page 12 ---	1-5
X	WO 94 01130 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 20 Janvier 1994 voir page 20 ---	1-3
A	WO 93 14126 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 22 Juillet 1993 voir le document en entier ---	1-25
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 Janvier 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04.02.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar Internationale No
PCT/FR 96/01006

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	CELLULAR PHARMACOLOGY 3 (2). 1996. 68-73, XP000616506 LE CONTEL C ET AL: "Identification of the beta-2m derived epitope responsible for neutralization of HIV isolates." voir le document en entier -----	1-25

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 96/01006

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9424290	27-10-94	AU-A- 6435294 AU-A- 6435394 EP-A- 0692027 EP-A- 0693125 WO-A- 9424280	08-11-94 08-11-94 17-01-96 24-01-96 27-10-94
WO-A-9218630	29-10-92	FR-A- 2675508	23-10-92
WO-A-9401130	20-01-94	AU-A- 4576293 CA-A- 2140150 EP-A- 0650369 JP-T- 7508984	31-01-94 20-01-94 03-05-95 05-10-95
WO-A-9314126	22-07-93	AU-A- 3359693 CA-A- 2128211 EP-A- 0623147 JP-T- 7505613	03-08-93 22-07-93 09-11-94 22-06-95